

Untersuchungen zur Struktur
des Basalmembranproteins Laminin

Konrad Achim Schmetz

Disbui. München

1988

Untersuchungen zur Struktur
des Basalmembranproteins
Laminin

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Konrad Achim Schmetz
aus Brühl

Oktober 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Bandlow

2. Berichterstatter: Prof. Dr. B. Linzen

Sondervotum: Prof. Dr. K. Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 02. März 1988

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Kühn, der es mir ermöglichte, die Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können, danke ich für die interessante Themenstellung und ständige Unterstützung.

Herrn Prof. Dr. Bandlow danke ich für die Betreuung der Arbeit und das entgegengebrachte Interesse.

Mein besonderer Dank gilt ferner Herrn Dr. Deutzmann für seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Frau Sabine Tolle, Frau Monika Birkmeir, Frau Hanna Wiedemann und Herrn Albert Ries möchte ich für die ausgezeichnete technische und praktische Unterstützung sowie für die gute Zusammenarbeit herzlich danken.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

1.	Einleitung	1
1.1.	Laminin als Bestandteil der Basalmembran	1
1.2.	Laminin als multifunktionelles Basalmembranprotein	5
1.2.1.	Zelladhäsion	5
1.2.2.	Zellwachstum	6
1.2.3.	Zellmorphologie	8
1.2.4.	Zelldifferenzierung	8
1.2.5.	Zellwanderung	9
1.3.	Die Struktur des Basalmembranproteins Laminin	11
2.	Problemstellung	19
3.	Material und Methoden	21
3.1.	Lamininreinigung aus dem EHS-Tumor	21
3.2.	Proteolytische Spaltungen	23
3.3.	Chemische Modifikationsmethoden	24
3.4.	Chromatographische Methoden	25
3.4.1.	Klassische Gelfiltration	25
3.4.2.	Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose	26
3.4.3.	Protein- und Peptidtrennung auf HPLC	27
3.5.	Analytische Methoden	31
3.5.1.	Disk-SDS-PAGE mit Proteinnachweismethoden	31
3.5.1.1.	Silberfärbung	35
3.5.1.2.	Western-Blot	37

3.5.2.	Automatische Sequenzanalyse	41
3.6.	Elektronenmikroskopie	43
3.7.	Dialyse	44
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Lamininreinigung	45
4.2.	Limitierte Lamininproteolysen zur E8-Reinigung	45
4.2.1.	Analytische Vorversuche	46
4.2.1.1.	Proteolyse mit Trypsin	46
4.2.1.2.	Reinigung des tryptischen Lamininfragmentes E8	48
4.2.1.3.	Proteolyse mit Elastase und E8-Reinigung	52
4.2.2.	Präparative Versuche	55
4.2.2.1.	Proteolyse mit Elastase	55
4.2.2.2.	Trennung der Elastase-Fragmente auf Agarose	55
4.2.2.3.	Reinigung des Elastase-Fragmentes E8 auf Heparin-Sepharose	58
4.3.	Limitierte Proteolyse des Lamininfragmentes E8 und Charakterisierung der E8-Subfragmente	65
4.3.1.	Tryptische Proteolyse des E8 in Subfragmente	65
4.3.2.	Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Elektronenmikroskopie	67
4.3.3.	Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Disk-SDS-PAGE	71
4.3.4.	Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Western-Blot	73
4.4.	Proteinchemische Analyse der tryptischen Proteolyseprodukte des Lamininfragmentes E8	76
4.4.1.	Sequenzanalyse der niedermolekularen E8-Peptide	79
4.4.2.	Sequenzanalyse des E8-Subfragmentes S5	83
4.4.3.	Sequenzanalyse des E8-Subfragmentes S4	87
4.4.4.	Sequenzanalyse der E8-Subfragmente S2 und S3	91

4.4.5.	Tryptische Nachspaltung des E8-Subfragmentes S1	92
4.5.	Aminoterminal Sequenzanalysen des E8, des 25 kD- und des S5-Subfragmentes	94
4.5.1.	Aminoterminal Sequenzanalysen des E8-Subfragmentes S5	98
4.5.2.	Aminoterminal Sequenzierung des reduzierten und nicht-reduzierten 25 kD-Fragmentes	99
4.5.3.	Aminoterminal Sequenzierung und Trennung der A- und B-Kettenabschnitte aus E8	103
4.5.3.1.	Aminoterminal Sequenzierung der B-Kettenabschnitte	109
4.5.3.2.	Aminoterminal Sequenzierung des A-Kettenabschnittes	116
4.6.	Proteinchemische Charakterisierung des Lamininfragmentes E3	118
5.	Diskussion	124
5.1.	Untersuchung der E8-Subfragmente S1 bis S5	127
5.2.	Untersuchung der Lamininkettenabschnitte aus E8	133
6.	Zusammenfassung	138
7.	Literaturverzeichnis	140
	Abkürzungen	149

1. Einleitung

1.1. Laminin als Bestandteil der Basalmembran

Die Basalmembran umschließt als flächenartige Struktur der extrazellulären Matrix Muskel-, Nerven-, oder Fettzellen und unterlegt epitheliale oder endotheliale Zellschichten (Madri et al., 1984). Basalmembranen sind für die Morphogenese und Funktionsausübung differenzierter Zellen im gesamten Organismus von Bedeutung (Bernfield et al., 1984; Timpl und Dziadek, 1986).

Insbesondere konnten Basalmembranen aus folgenden Geweben gewonnen werden (Heathcote und Grant, 1981):

Im Auge befindet sich eine Basalmembran am Cornea-Epithel (Meier und Drake, 1984; Sugrue und Hay, 1981; 1982); im murinen Säugetierembryo trennt eine Basalmembran, die als Reichert's Membran bezeichnet wird, den Embryo vom Trophoblasten bzw. vom mütterlichen Gewebe ab (Hogan et al., 1984; Inoue et al., 1983); in der Niere liegt eine Basalmembran zwischen epithelialen und endothelialen Zellschichten der Nierenglomeruli (Laurie et al., 1984; Jaffe et al., 1984). In diesem Organ wirkt sie als Filtrationsbarriere für hochmolekulare Proteine, die im Blut



zurückgehalten werden (Farquhar, 1981; Robinson und Brown, 1977).

Aus den genannten Beispielen wird die Bedeutung der Basalmembran sowohl für die strukturelle Entwicklung (Kephallides, 1973) als auch für die Aufrechterhaltung vielfältiger funktioneller Leistungen des Organismus deutlich (Vracko, 1974; 1982).

Zunächst konnte die Basalmembran histologisch mit der Schiffschen Periodat-Farbreaktion nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu Zellmembranen bestehen Basalmembranen hauptsächlich aus Glykoproteinen und Proteoglykanen und enthalten kaum Lipide (Dziadek et al., 1985a). Die Anzahl der Basalmembrankomponenten wird auf 50 geschätzt (Timpl und Dziadek, 1986). Andererseits konnten durch zweidimensionale Gelelektrophorese etwa 100 Polypeptidketten unterschieden werden (Heikendorff und Ledet, 1983). Allerdings sind bis heute nur wenige Struktureinheiten hinreichend gut charakterisiert. Zu den näher charakterisierten Proteinen gehören Kollagen IV, Laminin und Nidogen (Timpl et al., 1984); außerdem liegen biochemische Daten der hoch- und niedermolekularen Proteoglykane vor (Höök et al., 1984).

In der Regel kann man, wie in Abb. 1 gezeigt, zwei Schichten der Basalmembran unterscheiden (Kephallides et al., 1979; Martinez-Hernandez und Amenta, 1983). Die Lamina lucida grenzt an die endothelialen oder epithelialen Zellschichten an, während die Lamina densa als Lamina reticularis in das Bindegewebe übergeht. Die Basalmembran

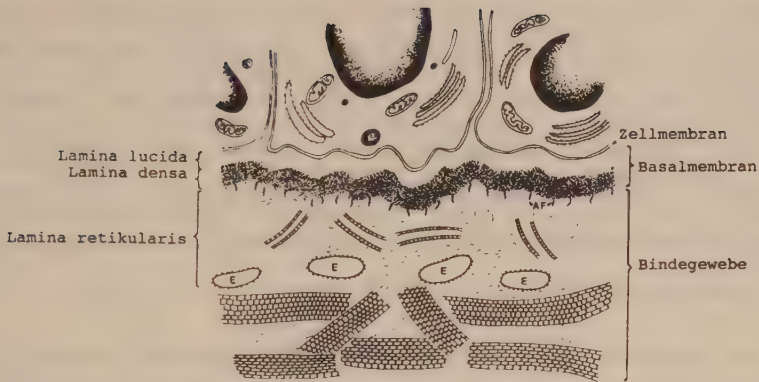


Abb. 1:

Diagramm einer Basalmembran, die epitheliale Zellen von mesenchymalen Bindegewebe trennt.

Die Basalmembran besteht aus zwei Schichten mit unterschiedlicher elektronenoptischer Dichte, der Lamina lucida und der Lamina densa. Die Lamina lucida liegt basal an den Epithelzellen, während die Lamina densa als Lamina retikularis in das Bindegewebe übergeht.

Ankerfibrillen (AF) binden die Lamina densa an die Lamina retikularis. Die Lamina retikularis enthält neben Strukturproteinen und Proteoglykanen auch elastische Fasern (E). Unterhalb der Lamina retikularis wird das Bindegewebe hauptsächlich durch interstitielle Kollagene stabilisiert. Die Abb. stammt aus Martinez-Hernandez und Amenta, 1983.

grenzt somit das Bindegewebe, das in der Regel hauptsächlich aus Fibroblasten und den interstitiellen Kollagenen besteht, von den endothelialen oder epithelialen Zellen ab.

Die Dicke der Lamina lucida beträgt 10-50 nm, während die Lamina densa in Abhängigkeit des Gewebetyps 30-300 nm dick ist (Timpl und Dziadek, 1986). Die flächenartige Grundstruktur der Basalmembran wird durch selbstaggregierendes Kollagen IV gewährleistet, das ein dichtes Netzwerk bildet

(Kühn et al., 1981; Timpl et al., 1981). Die Proteoglykane dienen in erster Linie als hydrophile, wasserbindende Füllsubstanzen und sind wegen ihrer ionischen Ladungseigenschaften für die Filtrationswirkung von Bedeutung. Laminin übt mit seiner Bindungsfähigkeit sowohl an Kollagen IV (Charonis et al., 1985; Laurie et al., 1986) als auch an die benachbarten epithelialen oder endothelialen Zellschichten eine Mediatorfunktion aus (siehe Kap. 1.2. und 1.3.).

Die Synthese der Basalmembran wird in der Regel von Epithel- oder Endothelzellen durchgeführt. Die Aggregation der einzelnen Komponenten zu der dreidimensionalen Struktur der Basalmembran ist jedoch bis heute nicht im einzelnen geklärt. Einzelne Komponenten aggregieren spontan zu sogenannten Matrisomen, die es gestatten strukturelle und funktionelle Effekte in vitro zu untersuchen (Martin et al., 1984; Kleinman et al., 1983; 1986; Terranova et al., 1986).

In vivo ist die exakte Anordnung des multifunktionellen Basalmembranproteins Laminin noch nicht genau geklärt. Frühere Daten zeigten, daß Laminin vorzugsweise in der Lamina lucida und Kollagen IV in der Lamina densa vorkommen (Yaoita et al., 1978; Roll et al., 1980; Courtoy et al., 1982). Neuere Untersuchungen, die auf immunhistologischen Methoden beruhen, legen jedoch nahe, daß Laminin auch in der Lamina densa angeordnet ist (Laurie et al., 1982; Fleischmajer et al., 1985).

1.2. Laminin als multifunktionelles Basalmembranprotein

Als multifunktionelles Basalmembranprotein vereint Laminin viele biologische Aktivitäten. Laminin beeinflusst Adhäsion, Wachstum, Morphologie, Differenzierung, Wanderungen von Zellen sowie die Aggregation der Basalmembran (Timpl und Dziadek, 1986; Timpl et al., 1983; Kleinman et al., 1984; 1985).

1.2.1. Zelladhäsion

In vitro Studien zeigen, daß Laminin die Adhäsion von epithelialen Zellen, aber nicht von mesenchymalen Zellen an Kollagen IV - Substrate fördert (Terranova et al., 1980; Kleinman et al., 1981). Die Zellen haften unter bestimmten Kulturbedingungen sehr schnell an Laminin und nehmen eine breite oder längliche Form an.

Durch Studien mit Affinitätschromatographie und Western-Blot konnte ein spezifischer Lamininrezeptor (MG etwa 67 kD) auf Epithel-, Muskel- (Lesot et al., 1983) und Tumorzellen (Barsky et al., 1984a) nachgewiesen werden (Mark, v.d. und Kühl, 1985).

Gegen den Lamininrezeptor eines Mammakarzinoms wurden monoklonale Antikörper isoliert, die die Lamininbindung an den Rezeptor inhibieren (Liotta et al., 1985). Ein monoklonaler Antikörper, der gegen Melanoma-Zellen gerichtet ist, inhibiert spezifisch die Adhäsion an Laminin, aber nicht an Kollagen IV oder Fibronectin. Direkte Bindung der Antikörper an den Lamininrezeptor konnte jedoch nicht

gezeigt werden (Timpl und Dziadek, 1986).

Es gibt indirekte Evidenzen, daß der Lamininrezeptor mit dem intrazellulären Cytoskelett assoziiert ist (Sugrue und Hay, 1981; Madri et al., 1984; Cody und Wicha, 1986). Die Transmittersignale und die cytoplasmatischen Interaktionspartner sind allerdings noch Gegenstand der aktuellen Forschung.

Kürzlich wurde gezeigt, daß Laminin spezifisch an gereinigte 5'-Nukleotidase bindet, die andererseits wiederum mit filamentösem Aktin, einer Komponente des intrazellulären Cytoskelettes, interagiert (Dieckhoff und Mannherz, 1985). Neben einem Anstieg der 5'-Nukleotidaseaktivität durch Laminin (Dieckhoff et al., 1986; 1987) konnten strukturelle Ähnlichkeiten zwischen diesem Enzym und dem Lamininrezeptor festgestellt werden (Mark, v.d. und Kühl, 1985).

Die Arbeitsgruppe um Liotta veröffentlichte kürzlich die carboxy-terminale Hälfte der cDNA-Sequenz des Lamininrezeptors aus normalem und neoplastischem Gewebe (Wever et al., 1986). Die Menge der etwa 1,7 kb langen mRNA korreliert mit der Zahl der Lamininrezeptoren auf der Zelloberfläche.

1.2.2. Zellwachstum

Laminin fördert das Wachstum verschiedener Zelltypen wie z.B.: Neuriten (Baron van Evercooren et al., 1982; Edgar et al., 1984), Schwannzellen (Mc Garvey et al., 1984) und verschiedener Tumorzellen.

Laminin fördert schnelles Neuritenwachstum in dosisabhängiger Form (Baron van Evercooren et al., 1982; Manthorpe et al., 1983; Carbonetto et al., 1983; Rogers et al., 1983; Edgar et al., 1984). Außerdem erhöht Laminin den wachstumsfördernden Effekt des Nervenwachstumsfaktors (Edgar et al., 1984); die gesamte Aktivität kann durch anti-Lamininantikörper inhibiert werden (Baron van Evercooren et al., 1982).

Durch Inhibitionsstudien mit Antikörpern und Fragmentstudien konnte am Ende des langen Lamininarmes eine Stelle identifiziert werden, die das Neuritenwachstum fördert (Edgar et al., 1984). In den kurzen Armen liegen zudem im zentralen Bereich ebenfalls Zellbindungsstellen; eine Neuronen-bindende Stelle kann de novo nach Proteolyse in den kurzen Armen entstehen (Edgar et al., 1984).

Studien mit konditioniertem Medium von Schwannzellen (Manthorpe et al., 1981; 1983) und Herzzellen (Edgar et al., 1984) zeigen gleiche Stimulationswirkungen des Neuritenwachstums wie Laminin. Analysen der beteiligten Faktoren von Schwannzellen (Davis et al., 1985) und Myotuben (Calof und Reichardt, 1984) zeigen, daß diese Faktoren mit Laminin in Beziehung stehen, aber nicht identisch mit Laminin sind. Die Faktoren könnten einen großen Komplex bilden, der aus Proteinen und Heparansulfatproteoglykanen besteht (Lander et al., 1982; 1985).

1.2.3. Zellmorphologie

Laminin induziert erhebliche morphologische Veränderungen bestimmter Zellen *in vitro*.

Durch Laminin kann die Reorganisation des Cytoskelettes unter der Beteiligung assoziierter Proteine induziert werden (Madri et al., 1984); die Bildung stabiler und glatter Zelloberflächen wird ausgelöst. Die Bildung von epithelialen Basalmembranen kann durch Laminin oder anti-Lamininantikörper verhindert werden und somit die Ausbildung der Zellpolarität (Grover et al., 1983).

1.2.4 Zelldifferenzierung

Verschiedene Studien zeigen, daß Laminin eine Schlüsselstellung in der Entwicklung multizellulärer Organismen einnimmt.

Bereits im 2-Zellstadium können durch Immunfluoreszenzfärbungen punktuelle Verteilungen von Lamininkomponenten auf der Blastomerenoberfläche nachgewiesen werden; dieses Verteilungsmuster überdauert bis zum 8-Blastomerenstadium (Dziadek und Timpl, 1985).

Immunpräzipitationen zeigten, daß zuerst nur die B-Ketten von Laminin im 2- bis 4-Zellstadium synthetisiert werden. Die A-Kette erscheint zur gleichen Zeit mit Nidogen im 8- bis 16-Zellstadium (Cooper und MacQueen, 1983).

Die Bildung von Laminin-Nidogen-Komplexen in diesem Stadium kann für die Verschmelzung und Entwicklung der Blastozyste bedeutsam sein. Nidogen und Laminin zeigen äquimolare

Komplexe im Gewebe mit hoher Affinitätskonstante (Dziadek und Timpl, 1985; Dziadek et al., 1985b). Elektronenmikroskopisch konnte eine Bindung des Nidogens an das Zentrum des Lamininkreuzes nachgewiesen werden. Insgesamt ist Laminin an vielfältigen Zell-Zell-Interaktionen des frühen Mausembryos beteiligt (Wu et al., 1983).

Laminin kann Zellproliferationen stimulieren (Mc Garvey et al., 1984) und neue oder beschleunigte Differenzierungswege der Teratokarzinom- (Darmon, 1982), Melanom- (Kleinman et al., 1986) und Muskelzellen (Kühl et al., 1986) induzieren.

1.2.5. Zellwanderung

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, daß Laminin Zellwanderungen fördert. Diese Zellwanderungen finden während der Embryogenese (Thiery et al., 1985), der Wundheilung und der Metastasierung von Tumorzellen (Terranova et al., 1984; McCarthy et al., 1985) statt.

Während der Embryogenese wandern Neuralleistenzellen auf Fibronektinschichten, wogegen sie in Kontakt mit Laminin zu aggregieren beginnen (Rovasio et al., 1983).

Laminin unterstützt neben Fibronektin die Wundheilung durch chemotaktische Wirkung auf endotheliale Zellen, die an der Vaskularisierung des heilenden Gewebes beteiligt sind (Grotenhorst und Martin, 1986).

Invasive Tumorzellen überwinden während ihrer Verbreitung die Basalmembranen (Terranova et al., 1986; Liotta, 1986). Liotta et al. (1983, 1986) postulierte drei Hauptphasen, die in der Progression der Tumorzelle durch eine Basalmembran stattfinden:

Der erste Schritt besteht in der spezifischen Anhaftung der Tumorzelle mittels Zellrezeptoren; zweitens findet eine lokale enzymatische Auflösung der Basalmembran statt, die es der Tumorzelle im dritten Schritt gestatten in das anliegende Gewebe einzudringen.

Verschiedene Untersuchungen zeigten eine positive Korrelation zwischen der Anwesenheit von endogenem Laminin auf der Oberfläche von Fibrosarkoma-Zellen und ihrem Metastasepotential (McCoy et al., 1982; Malinoff et al., 1984; Situ et al., 1984). Zugabe von exogenem Laminin steigerte die Zellmotilität und bewirkt, daß aus geringfügig metastasierenden Zellen hochmaligne Tumorzellen werden.

Studien mit Melanoma-Zellen in vivo weisen auf eine Mediatorfunktion des Laminins zwischen Basalmembran und der sich anheftenden Tumorzelle hin (Barsky et al., 1984b). Zusammenfassend zeigen zahlreiche Daten, daß Laminin phenotypisch das Metastasepotential der Tumorzellen erhöht.

Die vielfältigen Funktionen im Gesamtorganismus begründen die Notwendigkeit der Strukturaufklärung des multidomänen Basalmembranproteins Laminin.

1.3. Die Struktur des Basalmembranproteins Laminin

Trotz intensiver Bemühungen ist es bis heute nicht gelungen Laminin in intakter Form aus der Basalmembran präparativ zu isolieren; es konnten lediglich Lamininfragmente durch proteolytischen Abbau oder chaotrope Detergentien gewonnen werden (Ohno et al., 1983; Risteli und Timpl, 1981; Wewer et al., 1983). Kürzlich gelang es durch Anwendung von EDTA intaktes Laminin in geringer Ausbeute zu reinigen (Dixit, 1985; Ohno et al., 1985 und 1986).

Ein entscheidender Durchbruch in der strukturellen Erforschung des Lamininmoleküls gelang 1977 in der Etablierung des EHS (Engelbreth-Holm-Swarm)-Tumors (Orkin et al., 1977), aus dem Laminin in intakter Form und großen Ausbeuten gewonnen werden konnte.

Während Chung et al. (1977; 1979) gelelektrophoretisch zwei Banden bei 400 kD und 200 kD, die als Glykoproteine GP1 und GP2 bezeichnet wurden, auftrennen konnte, gelang es Timpl et al. (1979) beide Proteinketten als Komponenten eines Moleküls zu erkennen.

Ein einzelnes Lamininmolekül (MG etwa 950 kD) besteht nach gegenwärtiger Ansicht aus zwei ähnlichen B-Ketten, B1 und B2, sowie einer einzelnen A-Kette (Howe und Dietzschold, 1983). Die A-Kette (MG etwa 440 kD) und die B1- und B2-Ketten (MG etwa 250 kD und 230 kD) können nach Reduktion und Alkylierung des Laminins gelelektrophoretisch

aufgetrennt werden (Huber, 1986). Die Anordnung der Lamininketten in der Molekülstruktur konnte aber erst durch Kombination von cDNA-Sequenzen und proteinchemischen Sequenzdaten in einem Strukturmodell festgelegt werden (siehe eigene Untersuchungen in Abb. 3).

Durch ein Spezialverfahren der Elektronenmikroskopie, rotary shadowing (Shotton et al., 1979), konnte zunächst die kreuzförmige Molekülstruktur (Abb. 2), die als Grundlage für die Entwicklung eines Strukturmodells diente, unmittelbar sichtbar gemacht werden (Engel et al., 1981). Die kurzen Arme gleichen sich morphologisch; sie sind 37 nm lang und enthalten jeweils zwei globuläre Domänen, die in endständiger bzw. zentraler Position gelegen sind. Der lange Arm endet mit einer Gesamtlänge von 77 nm in einer endständigen globulären Domäne.

Am Aufbau des stäbchenförmigen Teils des langen Armes sind α -helikale Sekundärstrukturen beteiligt (Barlow et al., 1984). Die endständige, globuläre Domäne enthält dagegen β -Faltstruktur (Ott et al., 1982); durch Negativkontrastierung sind elektronenmikroskopisch oftmals drei Subdomänen unterscheidbar (Paulsson et al., 1985). Außerdem weist die endständige, globuläre Domäne des langen Lamininarmes eine hohe Bindungsaffinität an Heparin-Sepharose auf (Sakashita et al., 1980; Ott et al., 1982). An dieser Bindungsfähigkeit des Glykoproteins Laminin scheinen Kohlenhydratseitenketten nicht beteiligt zu sein (Howe, 1984).

Abb. 2:
Elektronenmikroskopische
Aufnahme des Basalmembran-
proteins Laminin mit dem
rotary shadowing Verfahren.
Die Abb. stammt aus Timpl
et al., 1983.

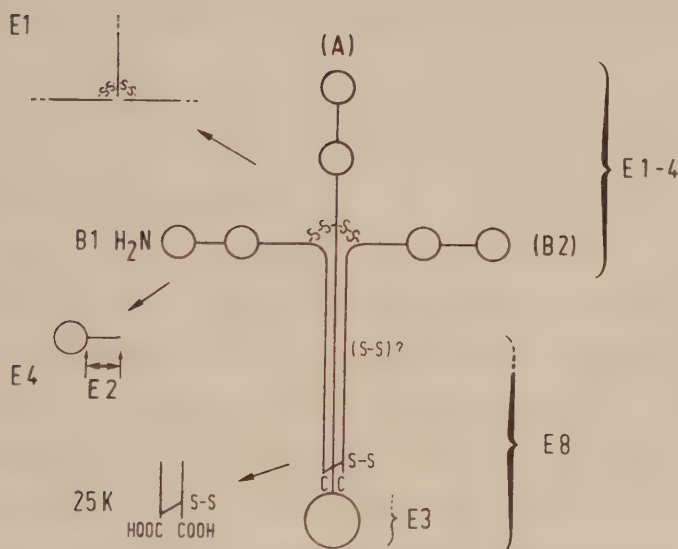
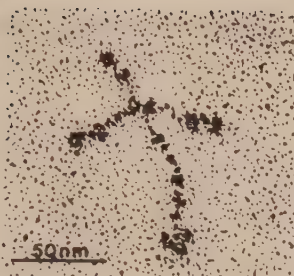


Abb. 3:
Strukturmodell des Basalmembranproteins Laminin, das auf
eigenen Untersuchungen am E8 beruht.
Die Lamininfragmente E1-4, E1, E2, E4, 25k, E8 und E3 sind
eingezeichnet. Der Verlauf der A-Kette sowie der B1- und
B2-Kette sind ersichtlich. Außerdem kann die Lage von
Disulfidbrücken (S-S) und amino- (H₂N) oder carboxy- (C bzw.
COOH) Enden entnommen werden. Einzelheiten zum Lamininstruk-
turmodell sind im Text (Kap. 1.3.) dargestellt.

Zu 13 % des Lamininmolekulargewichtes tragen N-glykosidisch gebundene Oligosaccharide vom komplexen Typ bei (Chung et al., 1979; Engvall et al., 1983; Howe, 1984), die eine Bindung des Laminins an Lektine hervorrufen (Rao et al., 1983). Neuere Untersuchungen konnten strukturelle Details aufklären und zeigen, daß ein Lamininmolekül etwa 43 Asparagin-gebundene Kohlenhydratseitenketten enthält (Arumugham et al., 1986). Die biologische Bedeutung der Kohlenhydrate ist unbekannt, jedoch sind sie für eine erhöhte proteolytische Resistenz nicht von Bedeutung (Howe, 1984).

Zunächst wurde durch limitierte Proteolysen mit verschiedenen Proteasen eine Reihe von Lamininfragmenten hergestellt (siehe Abb. 3). Die Lamininfragmente dienten sowohl zur strukturellen Aufklärung als auch zur Untersuchung der vielfältigen Funktionen des multidomänen Lamininmoleküls (siehe Kap. 1.2.). Die Lokalisierung der einzelnen Lamininfragmente erfolgte durch Kombination immunologischer und elektronenmikroskopischer Methoden (Ott et al., 1982; Rao et al., 1982b; Palm et al., 1985).

Mit Thrombin läßt sich ein Fragment herstellen, das im wesentlichen aus den drei kurzen Armen besteht; es wird als α_3 bezeichnet; der lange Arm wird weitgehend degradiert (Rao et al., 1982b).

Durch Pepsin wird Laminin weitgehend abgebaut. Als Endprodukt wird das Fragment P1 gebildet, das aus den kurzen Armen ohne globuläre Domänen besteht. Das Zentrum des

Lamininkreuzes enthält viele Disulfidbrücken und weist demzufolge eine hohe Proteaseresistenz auf (Rohde et al., 1980; Engel et al., 1981).

Insbesondere durch limitierte Proteolyse mit Elastase entstehen in Abhängigkeit der Spaltungsintensität verschieden große Fragmente, die in Abb. 3 bezeichnet sind. Als Endprodukt der Spaltung entsteht in Analogie zum P1 das proteolytisch hochresistente Fragment E1 aus dem Zentrum des Lamininkreuzes (Abb. 3). Unter milderer Abbaubedingungen läßt sich ein Fragment E1-4 gewinnen, das aus den kurzen Armen besteht und dem α_3 entspricht. Während E1-4 sowohl Zell- als auch Kollagen IV - Bindungsaktivität besitzt, geht im E1 die Kollagen IV - Interaktion nach Verlust der globulären Domänen verloren.

Neben den Abbauprodukten E1-4 und E1 (Abb. 3) entstehen durch limitierte Proteolyse mit Elastase unter schonenden Bedingungen weitere Lamininfragmente. Proteinchemisch bereits gut charakterisierte Fragmente sind E4 und E2 (Deutzmann et al., unveröffentl.) sowie E8 und E3 (eigene Untersuchungen). Die Lamininfragmente E5, E6 und E9, wurden zwar in der Literatur beschrieben, sind aber weder hinreichend gut charakterisiert noch eindeutig im Molekül lokalisiert (Timpl et al., 1983; Paulsson et al., 1985).

Das Elastasefragment E4 stammt aus der endständigen globulären Domäne mit dem sich anschließenden stäbchenförmigen Teil eines kurzen Lamininarmes. Die Trennung des 70 kD großen Fragmentes von den anderen Fragmenten erfolgt

hinreichend gut durch präparative Gelfiltration auf Agarose. Ein Vergleich der partiellen E4-Proteinsequenzdaten (Deutzmann et al., unveröffentl.) mit der kürzlich komplett veröffentlichten cDNA-Sequenz der B1-Kette (Sasaki et al., 1987) ergab den eindeutigen Nachweis, daß E4 den N-terminalen Teil der B1-Kette darstellt. Durch Aminopeptidase konnte E4 deblockiert werden und als N-Terminus der B1-Kette Pyroglutamat identifiziert werden (Deutzmann et al., unveröffentl.).

Das stäbchenförmige Elastasefragment E2 ist ein Abbauprodukt des E4-Fragmentes (Abb. 3); durch proteinchemische Sequenzanalyse konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (Deutzmann et al., unveröffentl.).

Aus Laminin werden durch limitierte Proteolyse mit Elastase die Fragmente E3 und E8 freigesetzt (Abb. 3), die aufgrund einer schwachen Bindungsfähigkeit an Heparin-Sepharose durch Affinitätschromatographie gereinigt werden.

Das Lamininfragment E3, dessen Molekulargewicht etwa 50 kD beträgt, stellt eine Heparin-bindende Subdomäne aus dem globulären Teil des langen Armes dar. Die globuläre Struktur des E3 besteht hauptsächlich aus β -Faltblättern, die durch CD-Spektroskopie nachgewiesen werden konnten (Ott et al., 1982). E8 umfaßt etwa die Hälfte des stäbchenförmigen Teils sowie die endständige, globuläre Domäne des langen Armes.

Durch die proteinchemische Charakterisierung der Lamininfragmente E3 und E8, die in dieser Arbeit

durchgeführt wurde, konnte erstmals ein Strukturmodell des Laminins aufgestellt werden, in dem der Verlauf der A-Kette sowie der B1- und B2-Ketten festliegt (Abb. 3).

Nach dem nun vorliegenden Modell bilden die N-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten jeweils einen der kurzen Arme und biegen im Kreuzungsschnittpunkt in den langen Arm ein, wo sie zu einer α -helikalen coiled-coil Struktur beitragen. Der N-terminale Teil der A-Kette bildet den dritten kurzen Arm; die A-Kette verläuft entlang der C-terminalen B-Kettenabschnitte durch den stäbchenförmigen Teil und endet als globuläre Domäne im langen Lamininarm.

Das dargestellte Modell beruht im wesentlichen auf der Kombination von cDNA-Daten der Lamininketten und proteinchemisch ermittelten Sequenzdaten der Lamininfragmente.

Zuerst wurden cDNA-Sequenzen der C-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten vorgelegt (Barlow et al., 1984); etwa 500 Aminosäurereste der B1-Kette und 200 Aminosäurereste der B2-Kette wurden bestimmt. Außerdem wurden proteinchemische Sequenzanalysen eines 25k-Fragmentes (Abb. 3) hinzugefügt, das direkt aus dem EHS-Tumor isoliert wurde. Das 25k-Fragment ist ein Heterodimer der C-terminalen B1-, B2- Kettenabschnitte, die nahe den C-Termini über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Paulsson et al., 1985).

Kürzlich wurde die komplette cDNA-Sequenz der B1-Kette veröffentlicht (Sasaki et al., 1987). Die komplette

cdNA-Sequenz der B2-Kette wurde in der gleichen Arbeitsgruppe ermittelt (Yamada, Y., pers. Mitteilung). Bezüglich der A-Kette liegen erst partielle cdNA-Sequenzen vor (Yamada, Y., Deutzmann und Huber, pers. Mitteilungen).

Bereits aus den cdNA-Sequenzen konnten interessante Hinweise auf die Sekundärstruktur im stäbchenförmigen Teil des langen Armes gewonnen werden. Etwa 350 Aminosäurereste der carboxy-terminalen B-Kettenabschnitte enthalten sich wiederholende Heptad-Primärstrukturen, die durch hydrophobe Aminosäurereste an dritter oder vierter Position gekennzeichnet sind. In den anderen Positionen werden nicht-hydrophobe Aminosäurereste bevorzugt.

Zwei α -Helices können sich in einer coiled-coil Struktur so umeinanderwinden, daß die hydrophoben Aminosäurereste interagieren können und zur Strukturstabilität beitragen (Cohen et al., 1986). Sequenztypische α -helikale Sekundärstrukturen sind bereits in Myosin (McLachlan und Karn, 1982), Tropomyosin (McLachlan und Stewart, 1975) und Intermediärfilamenten (Crewther et al., 1983; Geisler und Weber, 1982) beschrieben. Der Beitrag des A-Kettenabschnittes am strukturellen Aufbau dieses stäbchenförmigen Lamininteils könnte zu einer tripelhelikalen Struktur führen. Tripelhelikale coiled-coil Strukturelemente wurden z.B. im Membranglykoprotein Haemagglutinin des Influenzavirus' gefunden (Richardson, 1981).

2. Problemstellung

Die Notwendigkeit der Strukturaufklärung des Basalmembranproteins Laminin wird durch vielfältige Funktionen in der zellulären Organisation und Differenzierung begründet (siehe Kap. 1.2.).

Die proteolytische Fragmentierung des Proteins sollte sowohl zur Lokalisation der einzelnen Funktionen führen als auch den Verlauf der A- und B-Ketten im Molekülmodell festlegen.

Im Vordergrund stand die strukturelle Untersuchung der Fragmente E8 und E3 aus dem langen Lamininarm. E8 ist funktionell wegen seiner Zellbindungsstelle bedeutsam, insbesondere fördert E8 das Auswachsen von Neuriten (Edgar et al., 1984). E3, das eine globuläre Domäne des E8 darstellt, ist wegen seiner Bindungsstelle an Heparansulfat (Heparin) interessant.

Aus den folgenden Problemstellungen ergaben sich unmittelbar folgende Arbeitsziele:

Die Fragmente E8 und E3 konnten zunächst nur in geringen Ausbeuten unzureichend von den anderen Lamininfragmenten getrennt und isoliert werden.

- (1) Etablierung einer Reinigungsmethode zur präparativen Isolierung der Lamininfragmente E8 und E3 aus dem langen Lamininarm.

Aufgrund der Länge der A-Kette mit etwa 3500 Aminosäureresten kann die Ermittlung der Primärstruktur ökonomisch nur durch cDNA-Sequenzierung vorgenommen werden.

- (2) Bereitstellung proteinchemischer Partialsequenzen zur Identifizierung einer cDNA der A-Kette aus einer cDNA-Bank und Vergleich der gewonnenen cDNA-Sequenzdaten mit den proteinchemischen Partialsequenzen.

Der lange Lamininarm bzw. das Lamininfragment E8 besteht elektronenmikroskopisch aus Domänen mit unterschiedlicher Struktur: ein stäbchenförmiger "Stiel" und eine endständige globuläre Domäne, die sich in drei Subdomänen gliedert, sind unterscheidbar.

- (3) Fragmentierung des E8-Fragmentes aus dem langen Arm in Subfragmente und strukturelle Charakterisierung dieser Subfragmente durch koordinierte Anwendung proteinchemischer, immunologischer und elektronenmikroskopischer Methoden.

- (4) Die Beteiligung der A- und B-Ketten am Aufbau des E8-Fragmentes und die Aufstellung eines experimentell fundierten Gesamtmodelles des Lamininmoleküls.

3. Material und Methoden

3.1. Lamininreinigung aus dem EHS-Tumor

Das für die vorliegende Untersuchung verwendete Laminin wurde ausschließlich aus EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) - Tumoren, die in C57BL Mausstämmen wuchsen, isoliert. Zerkleinertes Tumorgewebe entwickelt sich nach subkutaner Injektion in etwa 4 Wochen zu festen Tumoren (ca. 5 g pro Maus).

- Waschen:

Eiterfreie Tumore werden in etwa gleicher Menge (w/v) Waschpuffer (3,5 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4) mit jeweils 50 µg/ml Proteaseinhibitoren (PMSF, CMBS) bei 4°C homogenisiert. Das Homogenisat wird solange zentrifugiert (30 min, 8500 x g) und in Waschpuffer resuspendiert bis der Überstand nur noch leicht gelblich gefärbt ist.

- Extraktion:

Der gewaschene Tumorniederschlag mit einer Ausbeute von etwa 72 % (w/w) wird in Waschpuffer, jedoch mit erniedrigter NaCl-Konzentration (0,5 M), auf etwa dreifaches Gesamtvolumen (w/v) gebracht und etwa 24 h bei 4°C als Suspension gerührt. Nach Zentrifugation (60 min, 8500 x g), zur Entfernung weiterer unlöslicher Bestandteile, befindet sich das extrahierte Laminin im Überstand. Zur Erhöhung der Ausbeute wird die Extraktion in der Regel fünfmal wiederholt. Die

vereinigten Überstände werden bei 4°C aufbewahrt.

- Fällung:

Nach erneuter Zugabe von Proteaseinhibitoren (PMSF, CMBS) wird innerhalb von 2 h die Endkonzentration an NaCl auf 1,7 M eingestellt. Nach Rühren (16 h bei 4°C) wird die Lösung zentrifugiert (60 min, 7000 x g). Erst nach Erhöhung der NaCl-Konzentration auf 4,5 M im Überstand fällt der größte Teil des Laminins unter Rühren innerhalb 16 h. Nach Zentrifugation (30 min, 7000 x g) enthält das Pellet das gefällte Laminin in einer Ausbeute von etwa 55 % (w/w) bezogen auf das Ausgangsgewicht des Tumors.

- Reinigung auf dem Anionenaustauscher:

Das Pellet wird in etwa 2 l DE52-Puffer (2 M Harnstoff, 50 mM Tris/HCl pH 8,6 mit jeweils 5 µg/ml Proteaseinhibitoren PMSF, CMBS) unter Rühren (5 h) gelöst. Die Lösung wird viermal gegen 8 l DE52-Puffer dialysiert und anschließend zentrifugiert (60 min, 28000 x g). Das Dialysat wird gemäß der Säulenkapazität (0,13 g/ml DE52) portionsweise auf die DE52-Säule aufgetragen. Die Elution des Laminins erfolgt mit linearem NaCl-Gradient DE52-Puffer mit 0 bis 0,6 M NaCl. Die vordere Peakhälfte enthält die reinsten Lamininfraktionen, während die Fraktionen der hinteren Peakhälfte zur weiteren Reinigung nach Volumeneinengung auf Amicon (Membran XM-300) und Dialyse in DE52-Startpuffer rechromatographiert werden.

- Reinigung durch Gelfiltration:

Nach Zugabe von Proteaseinhibitoren (PMSF, CMBS mit jeweils 20 µg/ml) wird die Lamininlösung in 1 M CaCl₂, 50 mM

Tris/HCl pH 7,5, 0,002% NaN_3 mit jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ Proteaseinhibitoren (PMSF, CMBS) viermal in 4,5 l dialysiert. Das auf dem Amicon (Membran XM-300) konzentrierte und zentrifugierte Dialysat (30 min, 20000 x g) wird auf eine Agarose 1,5m-Säule (150 x 4,5 cm) im Ausschlußvolumen eluiert.

- Aufbewahrung des Laminins:

Die vereinigten Lamininfraktionen werden gegen den Aufbewahrungspuffer 0,4 M NaCl, 50 mM Tris/HCl pH 7,4 mit jeweils 5 $\mu\text{g/ml}$ Proteaseinhibitoren mehrmals dialysiert. Das Dialysat wird auf Amicon (Membran XM-300) bis zur Löslichkeitsgrenze (etwa 1 g/ml) eingeengt. Eventuell entstehende unlösliche Lamininaggregate werden abzentrifugiert (1 h, 8500 x g). Die konzentrierte Lamininlösung wird bei 4°C aufbewahrt. Die Endausbeute an Laminin beträgt etwa 0,1 % (w/w) bezogen auf das Tumorausgangsmaterial. Die Ausbeute wird photometrisch nach Färbung mit Coomassie-Blau unter Verwendung von BSA als Eichprotein bestimmt.

3.2. Proteolytische Spaltungen

- Tryptische Lamininspaltungen:

Tryptische Spaltungen wurden mit Trypsin-TPCK (88% Protein von Worthington) mit der enzymatischen Aktivität von 236 u/mg durchgeführt. Gereinigte Lamininlösung (etwa 1 mg/ml, s.o.) wird mehrmals für 24 h gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Die Spaltungen werden im

Verhältnis 1:200 (w/w) Trypsin zu Laminin 6 h bei RT durchgeführt. Die Proteolyse wird durch Zugabe des Proteaseinhibitors PMSF, gelöst in DMSO, beendet; die Endkonzentration an gelöstem PMSF beträgt 20 µg/ml. Der Spaltungsansatz wird auf 4°C abgekühlt.

- Tryptische Spaltungen des Lamininfragmentes E8 und der E8-Subfragmente:

Hierbei wurde das obengenannte Trypsin (Fa. Worthington) wie angegeben in unterschiedlichen Temperatur- und Konzentrationsverhältnissen benutzt.

- Elastasespaltung:

Die Spaltung von Laminin mit Elastase (10 µg/ml, Fa. Boehringer) fand bei 37°C 16 h im Verhältnis 1:100 (w/w) in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat statt. Die Proteolyse wird durch PMSF, wie bei den tryptischen Spaltungen angegeben, inhibiert.

3.3. Chemische Modifikationsmethoden

- Reduktion und Alkylierung:

Proteine oder Peptide, die in Ammoniumhydrogencarbonat (bis 0,2 M) lyophilisiert sind, werden in Reduktionspuffer (6 M Guanidiniumchlorid, 1 mM EDTA, 0,1 M Tris/HCl pH 8,3) gelöst. Die Reduktion der Disulfidbrücken erfolgt nach Zugabe einer 0,2 M DTE-Lösung in Reduktionspuffer im Verhältnis 1:10 (v/v) zur Proteinelösung. Die Reaktion läuft

unter N_2 1 h bei $50^\circ C$ ab. Die Alkylierung wird durch Zugabe einer farblosen 0,44 M Natriumjodacetatlösung in Reduktionspuffer im Verhältnis 1:10 (v/v) eingeleitet. Hierdurch soll ein 1,1 M Überschuß an Natriumjodacetat über alle Mercaptogruppen in der Lösung erzielt werden. Die Reaktion findet unter N_2 1 h bei $37^\circ C$ im Dunkeln statt. Der Reaktionsansatz kann zur Auftrennung der alkylierten Proteine oder Peptide sofort auf eine Säule aufgetragen werden.

- Reduktion und Aminoethylierung:

Die Proteine werden wie beschrieben (s.o.) mit DTE reduziert. Die Aminoethylierung erfolgt nach Zugabe von 2 % (v/v) Ethylenimin 1 h bei RT.

3.4. Chromatographische Methoden

3.4.1. Klassische Gelfiltration

Nach Elastasespaltung von Laminin dient zur präparativen Auftrennung der Subfragmente (z.B. E3 und E8) eine Agarose 1,5m-Säule (200-400 mesh, 4 x 140 cm, Fa. Biorad).

Als Elutionspuffer wird 0,2 M NaCl, 0,05 M Tris/HCl pH 7,4 mit jeweils 10 $\mu g/ml$ Proteaseinhibitoren (PMSF, CMBS) verwendet. Der Fluß wird mit einer Perpex Peristaltic-Pumpe auf etwa 1 ml/min konstant gehalten.

Die Elution wird durch ein Spectrophotometer (Fa. Gilford) mit Durchflußküvette und einem 10" Recorder (Fa. Beckman)

bei O.D. 280 nm kontinuierlich aufgezeichnet.

Die Fraktionierung erfolgt durch den Fraktionssammler Ultrorac 7000 (Fa. LKB). Die Fraktionen werden nach Peakgröße vereinigt und zur Weiterverarbeitung gegen 0,05 M oder 0,2 M-Ammoniumhydrogencarbonat bei 4°C dialysiert.

3.4.2. Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose

Das Heparin in der Heparin-Sepharose CL-6B (Fa. Pharmacia) ist ein Mucopolysaccharid, das aus nativen Proteoglykanen, die aus der Darmschleimhaut des Schweins stammen, extrahiert wird. Gereinigtes Heparin ist ein unverzweigtes, hoch sulfatisiertes Glykosaminoglykan.

In vivo fungiert Heparin als Antikoagulanz, das selektiv an den Plasma-Proteaseinhibitor Antithrombin III bindet.

Aufgrund seines polyanionischen Charakters interagiert Heparin mit kationischen Molekülen; diese Wechselwirkungen bilden die Grundlage für die Proteinreinigung durch Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose CL-6B (Manual "Heparin-Sepharose CL-6B", Pharmacia).

- Methode:

Heparin-Sepharose CL-6B wird als gefriergetrocknetes Pulver in 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat als Startpuffer 15 min gequollen und mit etwa 200 ml Startpuffer pro g Pulver über einen Glasfilter gewaschen. 1 g Pulver ergibt ungefähr 4 ml gequollenes Gel. Die Säule wird mit Startpuffer gepackt. Die Proben werden gegen Startpuffer bei 4°C dialysiert und

aufgetragen. Das Eluat wird bei 4°C mit einer Perplex Peristaltic-Pumpe (Fa. LKB, Fluß: 1 ml/min) im Startpuffer recycelt. Das Volumen des Recycles entspricht etwa dem dreifachen Auftragsvolumen der Probe.

Die Elution (Fluß: 1 ml/min) wird bei RT mit Spectrophotometer 250 (Fa. Gilford) bei O.D. 280 nm verfolgt und durch den Fraktionssammler Ultrorac 7000 (Fa. LKB) fraktioniert. Die Elution beginnt mit einem Vorlauf in Startpuffer, 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat, bis ungebundene Proteine heruntergewaschen sind, d.h. die O.D. des Startpuffers erreicht ist.

An Heparin-Sepharose gebundene Proteine werden als Stufengradient mit ansteigender Ionenstärke mit den Elutionspuffern 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat und/oder 0,5 M NaCl eluiert. Die Eluate in 0,5 M NaCl werden in der Regel gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Das Dialysat wird entweder der limitierten Proteolyse unterworfen oder zur Weiterverarbeitung lyophilisiert.

3.4.3. Protein- und Peptidtrennungen auf HPLC

Die HPLC (High Pressure/Performance Liquid Chromatographie) nimmt eine zentrale Stellung unter den proteinchemischen Trennmethoden ein. Die Entwicklung von Hochdruck-Pumpensystemen mit konstanten Flußgeschwindigkeiten und druckstabilen Säulenmaterialien mit reproduzierbarer und gleichmäßiger Packung bilden die apparativen Voraussetzun-

gen.

Eine typische HPLC-Anlage besteht aus einem Injektor für die Probenapplikation, einem Hochdruck-Pumpensystem, einer Säule und einem Detektor. Ein Integrator für die Datenverarbeitung und ein Fraktionssammler können angeschlossen werden.

Die Elution erfolgt entweder isokratisch, bei der das Lösungsmittel unverändert beibehalten wird, oder als Gradientenelution, bei der durch Mischen der Lösungsmittel die Zusammensetzung der mobilen Phase kontinuierlich verändert wird.

Bei der Gelfiltration werden die Proteine aufgrund der Verteilung zwischen mobiler Phase im Partikelzwischenraum einerseits und in den Matrixporen andererseits getrennt. Die hydrophoben Wechselwirkungen sind bei der TSK-PW-Serie sehr gering ausgeprägt und gestatten effiziente Trennungen im hochmolekularen Bereich. Der Einsatz chaotroper Salze oder Detergentien (z.B. Guanidiniumchlorid, Natriumdodecylsulfat) verhindert die Assoziation und erhöht die Löslichkeit der denaturierten Proteine.

Bei der Umkehrphasenchromatographie (Reverse phase) findet eine Bindung zwischen unpolaren Oberflächen der stationären Phase und Proteinen statt, infolgedessen ergibt sich eine Abschirmung gegenüber der polaren mobilen Phase. Die differenzierte Ablösung erfolgt durch Gradientenelution mit steigender organischer Lösungsmittelkonzentration. Durch Erniedrigung der Oberflächenspannung und kompetitiver Wechselwirkung des organischen Eluens mit der hydrophoben Matrix werden die adsorbierten Moleküle zunehmend

solvatisiert und freigesetzt. Die Retention hängt demnach im wesentlichen vom Verhältnis polarer und unpolarer Aminosäureseitenketten ab, die an der Oberfläche exponiert sind. Bei größeren Proteinen können jedoch unterschiedliche strukturelle Konformationen zu erheblichen Retentionsdifferenzen führen. Als Puffersysteme werden Acetonitril- oder Isopropanol-Gradienten mit verdünnter TFA (0,1 % v/v) empfohlen (Seipke et al., 1986).

Die Protein- und Peptidtrennungen wurden auf folgenden HPLC-Systemen durchgeführt:

(1) HPLC-System I (isokratisch)

Pumpe: 2150 (Fa. LKB)

Photometer: Modell 153 (Fa. Beckman)

UV Detektor mit O.D. 280 nm

Analytical Optical Unit (Fa. Beckman)

Fraktionssammler: 2211 Superrac (Fa. LKB)

Schreiber: Servogor 120, 2-Kanal (Fa. BBC)

(2) HPLC-System II (isokratisch)

Pumpe: 2150 (Fa. LKB)

Photometer: UV/FIS Filter Photometer (Fa. Knauer)

Fraktionssammler: Ultrorac 7000 (Fa. LKB)

Schreiber: 10" Recorder (Fa. Beckman)

(3) HPLC-System III (Gradientensystem)

Steuergerät: Automated Gradient Controller (Fa. Waters)

Pumpen: A Modell 481 (Fa. Waters)

B Modell 481 (Fa. Waters)

Photometer: Modell 481 (Fa. Waters)

Lamda-Max LC Spectrophotometer

Wasserbad: R5/74 (Fa. Julabo)

Schreiber: 2210, 2-Kanal (Fa. LKB)

Als HPLC-Säulen wurden verwendet:

(1) Gelfiltration:

- Säulen:

Vorsäule GSWP (7,5 x 75 mm) (Fa. LKB, Altex)

TSK G4000SW (7,5 x 600 mm) (Fa. LKB)

TSK G3000SW (7,5 x 600 mm) (Fa. LKB, Altex)

TSK G2000SW (7,5 x 600 mm) (Fa. LKB, Altex)

- Puffer:

0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 % (v/v) TFA

0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 % (w/v) SDS, 0,1 % (v/v) TFA

6 M Guanidiniumchlorid, 0,1 M Natriumacetat pH 6,6

- Elutionsbedingungen (in der Regel):

Fluß: 0,15 ml/min

O.D. 220 nm oder 280 nm

Temp.: RT

(2) Umkehrphase:

- Säulen:

C4 Vydac 214TP54 (4,6 x 250 mm) (Fa. Latek)
 C18 Vydac 201TP54 (4,6 x 250 mm) (Fa. Latek)
 HD-Protein 7 μ (4,6 x 250 mm) (Fa. Gynkotek)

- Puffer (Gradientensystem):

A: 0,1 % TFA

B: 70 % (v/v) Acetonitril oder

70 % (v/v) Isopropanol

- Elutionsbedingungen (in der Regel):

Fluß: 1 ml/min

O.D. 220 nm oder 280 nm

Temp.: 55°C

3.5. Analytische Methoden

3.5.1. Disk-SDS-PAGE mit Proteinnachweismethoden

In der Diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Disk-SDS-PAGE) wird ein engporiges Trenngel (Tris-HCl-Puffer pH 6,8) mit einem weitporigen Sammelgel (Tris-HCl-Puffer pH 8,8) überschichtet. Die Elektrophorese erfolgt im Laufpuffer (pH 8,3) zwischen oberem kathodischen und unterem anodischen Pufferreservoir in einer Flachbettgelkammer nach Studier (1973). In der SDS-Gelelektrophorese ist die Beweglichkeit der Proteine eine lineare Funktion der Logarithmen ihrer Molekulargewichte. Durch SDS wird eine stark negative Ladung in die denaturierten Polypeptid-Ketten

eingeführt, die normalerweise alle vorhandenen Ladungen überdeckt.

Durch Disulfidbrücken verbundene Peptide können im Auftragspuffer unter Zugabe von 5 % (v/v) β -Mercaptoethanol, das die Disulfidbrücken zu Sulfhydryl-Gruppen reduziert, gespalten werden.

Ein gebräuchliches Puffersystem für die SDS-Gelelektrophorese wurde von Laemmli (1970) entwickelt. Zur Herstellung des Puffersystems werden folgende Lösungen benötigt:

Laufpuffer: 0,025 M Tris; 0,19 M Glycin; 0,1 % (w/v) SDS
pH 8,2-8,4

Auftragspuffer: 6,5 ml 1 M Tris/HCl pH 6,8 auf 100 ml H₂O
aufgefüllt; anschließend Hinzugabe von 10 ml
Glycerin; 5 ml 0,5 % Bromphenolblau; 3,2 ml
10 % (w/v) SDS

und die Stocklösungen A bis F:

- A 30 % (w/v) Acrylamid Stocklösungen
0,75 % (w/v) N,N'-Methylenbisacrylamid
- B 1 M Tris/HCl pH 8,8
- C 1 M Tris/HCl pH 6,8
- D 10 % (w/v) SDS
- E 5 % (v/v) TEMED
- F 1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat

Die Lösungen A, E und F werden dunkel bei etwa 8°C gelagert und regelmäßig erneuert.

Zur Herstellung der Acrylamid-Vorratslösungen in verschiedenen Endkonzentrationen werden folgende Vorratslösungen hergestellt:

a) Trenngel:

Endkonzentration

Acrylamid	3 %	5 %	10 %
Lösung A (ml)	10	17	33,3
Lösung B (ml)	40	40	37,5
H ₂ O (ml)	50	43	29,2

Endkonzentration

Acrylamid	20 %	25 %
Acrylamid (g)	20	25
Bisacrylamid (g)	0,4	0,4
Lösung B (ml)	40	40

H₂O wird jeweils auf 100 ml aufgefüllt

b) Sammelgel:

Endkonzentration

Acrylamid	2,5 %	4,5 %
Lösung A (ml)	8	15
Lösung C (ml)	12,4	12,4
H ₂ O (ml)	80,6	73,6

Die Acrylamid-Lösungen werden filtriert und dunkel bei 4°C gelagert. Zur Herstellung der Gradientengele werden in der Gradientenkammer folgende Gemische unter Verwendung der beschriebenen Vorratslösungen frisch angesetzt:

Trenngel:

Endkonzentration

Acrylamid	3 %	5 %	10 %	20 %	25 %
Vorratslösung (ml)	12	12	12	12	12
Lösung D (µl)	120	120	120	120	120
Lösung E (µl)	150	100	50	38	25
Lösung F (µl)	250	175	100	85	70

Sammelgel:

Endkonzentration

Acrylamid	2,5 %	4,5 %
Vorratslösung (ml)	12	12
Lösung D (µl)	120	120
Lösung E (µl)	200	200
Lösung F (µl)	400	400

Das Disk-SDS-Gel wird zwischen Ethanol gereinigten Glasplatten (16,5 x 13,5 cm, Vorderausschnitt 1,5 x 11 cm), die durch Abstandshalter (1,5 mm Stärke) getrennt sind, gegossen. Die Abdichtung der Gele findet durch in Wasser gelösten Kleister statt. Die Ausbildung eines linear ansteigenden Acrylamid-Konzentrationsgradienten im Trenngel wird mittels einer Perpex Peristaltic-Pumpe (Fa. LKB) bei einem Fluß vom etwa 1 ml/ min hergestellt. Das Trenngel wird während der Polymerisation zur Ausbildung einer scharfen Trennschicht mit 1-Butanol überschichtet. Die Polymerisation dauert etwa 2 h.

Im Sammelgel werden durch einen Probenkamm Auftragstaschen erzeugt. Lyophilisierte Proben werden in Probenpuffer 15 min bei 65°C erhitzt und nach Abkühlung mit einer Hamilton-spritze aufgetragen. Als Referenz werden hoch- oder niedrig-molekulare Markerproteingemische (Fa. Biorad) aufgetragen. Die Elektrophoresebedingungen sind 65 V und etwa 15 h.

Nach Auftrennung werden die Proteinbanden durch Inkubation in Färber-Lösung sichtbar gemacht; als empfindlichere Nachweismethode dient die Silberfärbung (siehe Kap. 3.5.1.1.). Das Gel wird von den Glasplatten entfernt und für etwa 30 min in Färber-Lösung (2,5 g Serva blau; 400 ml Ethanol; 400 ml 7 % (v/v) Essigsäure) inkubiert.

Nicht gebundener Farbstoff wird in Entfärber-Lösung, 35 % (v/v) Ethanol und 10 % (v/v) Essigsäure, entfernt. Das Gel kann anschließend entweder auf einer Leuchtplatte photographiert oder auf einem Heizsieb unter dem Vakuum einer Wasserstrahlpumpe getrocknet werden.

3.5.1.1. Silberfärbung

Die Silberfärbung basiert auf der Anfärbung der Proteinbanden in Polyacrylamidgelen mit Silberionen. Der Vorteil der Silberfärbung besteht gegenüber der Coomassiefärbung in einer wesentlich höheren Empfindlichkeit des Proteinnachweises.

Es gibt zwei verschiedene Grundverfahren, die sich in der Zusammensetzung der Silbersalz- und Entwicklerlösung unterscheiden:

(1) Verfahren nach Oakley:

Das Gel wird mit basischer Silberamidlösung getränkt und in saurer Lösung (Citronensäure) entwickelt (Oakley et al., 1980).

(2) Verfahren nach Merril:

Es wird eine neutrale, eventuell schwach saure Silbernitratlösung benutzt; die anschließende Entwicklung erfolgt in einer basischen Natriumcarbonatlösung (Merril et al., 1981).

- Methode:

- (1) Das Gel wird 15 min in 10% (w/w) Trichloressigsäure fixiert.
- (2) Anschließend wird das Gel 3 mal 10 min in H_2O inkubiert.
- (3) Es erfolgt eine Fixierung für 15 min in Lösung A: 1 g

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (bzw. 1,9 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ H}_2\text{O}$) gelöst in 96 ml H_2O unter Zugabe von 4 ml 25 % Glutaraldehyd.

- (4) Danach schüttelt man das Gel 3 mal 10 min in H_2O .
- (5) Zur Silberfärbung werden 1,84 ml 1 N NaOH und 1,96 ml 25 % Ammoniak hinzugefügt. Lösung B wird unter Rühren 4 ml einer 20 % (w/v) AgNO_3 zugesetzt. Das Gemisch wird mit H_2O auf 100 ml aufgefüllt. Die Silberfärbung dauert 15 min.
- (6) Schließlich wird das Gel innerhalb von 15 min mehrmals gewässert.
- (7) Die Färbung erfolgt innerhalb weniger Minuten nach Zugabe von Lösung C: 50 ml Ethanol werden nach Hinzufügen von 3 ml 1 % (w/v) frischangesetzter Citratlösung und 250 μl 37 % Formaldehyd mit H_2O auf 500 ml aufgefüllt.
- (8) Die Farbreaktion wird durch wiederholtes Auswaschen mit H_2O beendet.
- (9) Das Gel kann mit Lösung D (Farmer's Reducer) entfärbt werden. Lösung D: 10 ml 20 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ und 10 ml 1 % (w/v) $\text{K}_3(\text{Fe}(\text{CN})_6)$ werden mit H_2O auf 900 ml aufgefüllt.

Für die Silberfärbung wird ausschließlich H_2O (Millipore) verwendet.

3.5.1.2. Western-Blot

Ein Western-Blot besteht im Transfer eines Antigens auf eine Nitrocellulosemembran. Nach Inkubation mit einem antigen-spezifischen Antikörper kann das Antigen durch einen sekundären Antikörper, der eine Farbmarkierung einführt, sichtbar gemacht werden.

Auf Disk-SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können mit dieser Technik immunologisch nachgewiesen und charakterisiert werden. Der Western-Blot wurde von Towbin et al. (1979) mit polyklonalen Antikörpern entwickelt.

- Material:

Transferkammer mit Elektroden, Gelhalterung, Gelpolster (scotch-brite), und Kühlschleife. Spannungsgerät 0,5 A. Nitrocellulosemembran 0,45 μ (Fa. Biorad). Blot-Filterpapier (Fa. Biorad).

- Puffer und Antikörper:

Transferpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 30 % (v/v) Methanol pH 8,3. TBS: 43,8 g NaCl, 30,3 g Tris, 1 g NaN_3 in 5 l pH 7,4. BSA (Fa. Sigma). Sekundärer an Peroxidase gekoppelter Antikörper (Miles). Zur Nachweisreaktion: 0,1 M Na-cacodylat Puffer pH 6,0; Catechol (Merck); p-Phenylendiamin (Fa. Merck); 30 % H_2O_2 .

Lösung A: 1,0 mg/ml Catechol in Cacodylat Puffer.

Lösung B: 1,0 mg/ml p-Phenylendiamin in Cacodylat Puffer.

Anti-E3-Antikörper und anti-25k-Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Timpl zur Verfügung gestellt.

- Methode

- (1) Nach der Elektrophorese wird das ungefärbte Gel für mindestens 10 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert.
- (2) Zum Transfer wird folgende Schichtung hergestellt; jede Schicht wird in Transferpuffer getaucht: 1.) Gelpolster (scotch-brite), 2.) Blot-Filterpapier, 3.) Gel 4.) Nitrocellulosemembran, 5.) Blot-Filterpapier, 6.) Gelpolster (scotch-brite). Luftblasen zwischen den Schichten sind zu vermeiden.
- (3) Die Transferschichtung, durch die Gelhalterung befestigt, wird in Transferkammer gestellt, so daß die Nitrocellulosemembran in Richtung Anode steht. Die Transferkammer wird mit Transferpuffer angefüllt; die Temperatur des Transferpuffers wird durch Wasserkühlung und Zirkulation mittels Magnetprüher konstant gehalten.
- (4) Der Proteintransfer findet bei 4°C mit 0,3 A statt und ist nach 16 h beendet.
- (5) Nach dem Proteintransfer wird die Nitrocellulosemembran kurz in destilliertem Wasser getaucht und zwischen Filterpapier (Whatman) getrocknet. Nicht transferierte Proteine können im Gel mit Coomassie Blue gefärbt werden.
- (6) Die Nitrocellulosemembran wird für 2 h bei RT unter konstantem Schütteln in 2,5 % (w/v) TBS inkubiert, um

reaktive Stellen auf der Nitrocellulosemembran zu blockieren.

- (7) Die Nitrocellulosemembran wird in Antikörperlösung, die aus den entsprechenden Antigen-bindenden Antikörpern (z.B. anti-E3 oder anti-25K) in 2,5 % (w/v) BSA in TBS besteht, für 2 h bei RT inkubiert. Der Antikörpertiter entspricht 1:10 bis 1:200 Verdünnungen.
- (8) Nach dreimaligem Waschen innerhalb von 15 min in TBS inkubiert man die Nitrocellulosemembran im sekundären Antikörper, der in 2,5 % (w/v) BSA in TBS 1:400 verdünnt ist.
- (9) Die Färbung tritt nach 2-5 min in einem frischgesetzten Gemisch der Lösungen A und B (jeweils 50 ml) nach Zugabe von 25 μ l H_2O_2 ein.
- (10) Die Nitrocellulosemembran kann in TBS im Dunkeln aufbewahrt werden.

- Peroxidase - Antiperoxidase (PAP) Nachweisreaktion:

Die Markierung der positiven Antikörperreaktion erfolgt durch einen Komplex, der aus Peroxidase und anti-Peroxidase Antikörpern besteht. Der Vorteil dieser Technik ist die hohe Sensitivität durch Amplifikation der Farbreaktion.

- - Material:

Sekundärer Antikörper: Affinitätsgereinigtes anti-Kaninchen IgG (aus Ziege) gekoppelt mit Peroxidase (Biorad); PAP:

Kaninchen Peroxidase-Antiperoxidase Komplex (Miles);
 Farbreagenz; 4-Chloro-1-Naphthol (Fa. Sigma)

- - Methode:

Der Western-Blot wird von Schritt (1) bis (7) wie beschrieben durchgeführt.

(8) Als sekundärer Antikörper wird anti-Kaninchen IgG (Fa. Biorad) in der Verdünnung 1:3000 wie in (8, s.o.) verwendet.

(9) Nach dreimaligem Waschen in 2,5 % (w/v) BSA in TBS innerhalb von 15 min wird die Nitrocellulosemembran 2 h in 2,5 % (w/v) BSA in TBS mit PAP in der Verdünnung 1:300 inkubiert.

(10) Nach dreimaligem Waschen in TBS kann die Farbreaktion erfolgen.

(11) Für die Farbreaktion werden folgende Lösungen benötigt:

Lösung A: Zu 100 ml TBS pipettiert man bei RT 60 μ l 30 %ige H_2O_2 .

Lösung B: 60 mg 4-Chloro-1-Naphthol werden in 20 ml eiskühltem Methanol gelöst.

Zur Herstellung des Farbreagenz wird Lösung B in Lösung A überführt. Die Farbreaktion tritt in wenigen Minuten ein; sie wird durch Waschen in TBS beendet, in dem die Nitrocellulosemembran aufbewahrt werden kann.

3.5.2. Automatische Sequenzanalyse

Die automatische Sequenzanalyse von Proteinen (Flüssigphasensequenzier) wurde erstmalig von Edman und Begg (1967) beschrieben.

Eine wesentliche Verbesserung dieser Technik wurde durch die Einführung von Polybren, einem polymeren, quaternären Ammoniumsalz, erzielt (Tarr et al., 1978; Klapper et al., 1978). Polybren vermindert die Auswaschung des Restpeptides nach einigen Edman-Abbauschritten aus dem sich drehenden Reaktionsbecher, so daß maximal 70-80 Abbauschritte bei repetitiven Ausbeuten von 97-98 % erreicht werden.

Laursen (1971) entwickelte alternativ ein Festphasen-Sequenzierungssystem, bei dem das zu sequenzierende Peptid kovalent an derivatisiertes Polystyrolharz oder poröses Glas gebunden wird, um den Verlust des Restpeptides während des Edman-Abbaus zu verhindern. Ein methodischer Nachteil liegt jedoch in der unvollständigen oder unvorteilhaften Kopplung des Peptides; lückenhafte Sequenzierung kann an den Kopplungsstellen eintreten, die vor dem carboxyterminalen Rest liegen.

Mit der Entwicklung des Gasphasensequenzers (Hewick et al., 1981; Hunkapiller et al., 1983) gelang es weitgehend, die Vorteile beider Systeme zu verbinden:

- Flüssigphase:

vollständige Sequenzierung,
einfache Handhabung,

- Festphase:

verlustfreie Sequenzierung des Restpeptides.

Außerdem konnte durch Verbesserung der Reinheit der Lösungsmittel und durch Verkleinerung der Reaktionskammer auf 50 μ l die Proteinsequenzierung im subnanomolaren Bereich standardmäßig etabliert werden.

Zur automatischen Sequenzanalyse stehen ein Flüssigphasensequencer 890 C (Fa. Beckman) und ein Gasphasensequencer 470 A (Fa. Applied Biosystems) zur Verfügung:

- Flüssigphasensequencer

Die lyophilisierten Proteinproben werden in 50-100 % (v/v) Ameisensäure und mit 1 mg Polybren (auf Ionenaustauscher vorbereitet) aufgetragen. Zur sukzessiven Kopplung und Abspaltung der Aminosäurederivate wird ein modifiziertes 0,1 M Quadrol-Programm benutzt. Die Konvertierung findet anschließend automatisch im Autoconverter P6 (Fa. Sequemat) statt. Als Ölfilter werden die Typen OFC 002 (Fa. Pfeiffer) verwendet.

Zur Identifizierung der PTH Aminosäuren dient folgende HPLC-Anlage:

Probenaufgeber: ASI 720

Pumpe: 110A (Fa. Beckman)

Photometer: Modell 163 (Fa. Beckman)

Integrator: Shimadzu C-R3

Die Chromatographiebedingungen folgen der in der Literatur beschriebenen Methode nach Lottspeich (1980). Es handelt sich hierbei um ein isokratisches Detektionssystem bei

O.D. 263 nm und 59°C. Als Puffersystem wird folgendes Gemisch (1640 ml Acetonitril, 23 ml Dichlorethan, 22 ml 1 M Natriumacetat pH 4,4 unter Hinzugabe vom 2 mg/5 l Norleucin) über eine LiChroCart-Säule LiChopher CH-8/II (4 x 250 mm) recycelt.

- Gasphasensequenzier

Der Gasphasensequenzier 470A (Fa. Applied Biosystems) ist als on line System mit dem PTH-Analysator 120A (Fa. Applied Biosystems) verbunden. Die PTH-Detektion findet durch ein von Hunkapiller entwickeltes Gradientensystem statt. Der Gradient wird aus den Puffern A und B gemischt:

A: 3,5 % (v/v) Tetrahydrofuran, 30 ml 3 M Natriumacetat pH 3,8, 7 ml 3 M Natriumacetat pH 4,6 in 1 l H₂O

B: 100 % Acetonitril unter Zugabe von 500 mM DMPTU

Die Trennung wird auf einer Microbore-Säule PTH-C18 HPLC Cartridge (2,1 x 220 mm, Fa. Applied Biosystems) durchgeführt. Die Chromatographiebedingungen sind im User Bulletin (Hunkapiller, 1985) im einzelnen aufgeführt.

3.6. Elektronenmikroskopie

Laminin und seine Subfragmente werden durch die elektronenmikroskopische Technik (rotary shadowing) nach Shotton et al. (1979) sichtbar gemacht.

Die Proteinproben werden in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat mit einer Konzentration von 20-50 µg/ml gelöst und mit 87 %igem (v/v) Glycerin im Verhältnis 1:1 verdünnt.

Das Gemisch (1 ml) wird aus einer Entfernung von 30 cm auf eine Glimmerscheibe gesprüht. Die Glimmerscheibe wird unter Vakuum (2×10^{-6} Torr) bei 120 upm rotiert, mit Platin unter einem Winkel von 9° bedampft und anschließend mit Kohlenstoff bei 90° überschichtet.

Die Abdrücke werden auf destilliertem Wasser abflottiert und auf ein Kupfernetz (400 mesh) aufgenommen. Die Proben werden in einem Elektronenmikroskop Elmiscop 102 (Siemens) bei 80 kV mit einer 50 μ m Objektivblende sichtbar gemacht.

3.7. Dialyse

Alle Dialysen werden bei 4°C unter ständigem Rühren des Dialysepuffers durchgeführt. Die Dialyse ist in der Regel nach drei- bis viermaligem Wechsel des Dialysepuffers (5 oder 10 l) in 8- bis 16-stündigem Abstand beendet.

Die Dialysemembranen X100 ET (Fa. Union Carbide) werden wie folgt vorbereitet (Maniatis et al., 1982):

Die Dialysemembranen werden in geeignete Längen unter Benutzung von Vinylhandschuhen (Fa. Beiersdorf) geschnitten und in etwa 2 % (w/v) Natriumbicarbonat 10 min gekocht. Anschließend können die Dialysemembranen nach Spülen und Kochen (10 min) in H_2O (Millipore) bei 4°C aufbewahrt werden.

4. Ergebnisse

4.1. Lamininreinigung

Laminin wurde, wie in Kap. 3.1. beschrieben, aus dem EHS-Tumor extrahiert und aufgearbeitet. Die Lamininkonzentration wurde photometrisch zu 0,33 mg/ml bestimmt. Laminin läßt sich höchstens zu etwa 1 mg/ml einengen, danach beginnt es aufgrund erhöhter Aggregation auszufallen. Als Reinheits- und Gütekriterium wurde Laminin auf Disk-SDS-PAGE aufgetragen; nach Reduktion mit Mercaptoethanol werden Banden bei etwa 400 kD (A-Kette) und 200 kD (B-Ketten) sichtbar. Der Nachweis der genannten Banden gilt neben der elektronenmikroskopischen Darstellung als Nachweis für ein weitgehend intaktes Laminin (vgl. Abb. 2 in Kap. 1.3.).

4.2. Limitierte Lamininproteolysen zur E8-Reinigung

Zur Herstellung des Lamininfragmentes E8 wurde das gereinigte Laminin der limitierten Proteolyse unterworfen. In Vorversuchen mit den Proteasen Trypsin und Elastase wurden folgende Spaltungsbedingungen variiert:

- 1.) das Enzym : Substratverhältnis,
- 2.) die Reaktionsdauer,
- 3.) die Reaktionstemperatur.

Exemplarisch sind im folgenden einige Vorversuche dargestellt (Kap. 4.2.1.).

4.2.1. Analytische Vorversuche

4.2.1.1. Proteolyse mit Trypsin

Trypsin spaltet spezifisch hinter den Aminosäureresten Lysin und Arginin. Es wurden demzufolge durch tryptische Spaltungen homogene Fragmente erwartet, die zur proteinchemischen Charakterisierung vorteilhaft sind.

150 ml Lamininlösung (etwa 50 mg Laminin) wurden mit 100 µg Trypsin (Enzym:Substrat 1:500 w/w) bei Raumtemperatur gespalten. Die Spaltungsreaktion wurde nach 5 h mit Proteaseinhibitor PMSF beendet.

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (Daten nicht gezeigt) wurde entnommen, daß das Laminin noch weitgehend ungespalten war. Die Ausbeute an E8 war zu gering, um unter den genannten Spaltungsbedingungen ausreichende Mengen für eine proteinchemische Charakterisierung zu erhalten. Es zeigte sich, daß das unter ständiger Anwendung von Proteaseinhibitoren gereinigte Laminin (vgl. Kap. 3.1.) drastischer der limitierten Proteolyse unterworfen werden mußte als in der Literatur beschrieben (vgl. Paulsson et al., 1985).

Um dennoch Fragmente aus der tryptischen Proteolyse zu erhalten, wurde folglich die Enzymkonzentration und die Reaktionszeit erhöht. Die limitierte Proteolyse wurde in einem Enzym:Substratverhältnis 1:200 (w/w) nach 6 h beendet.

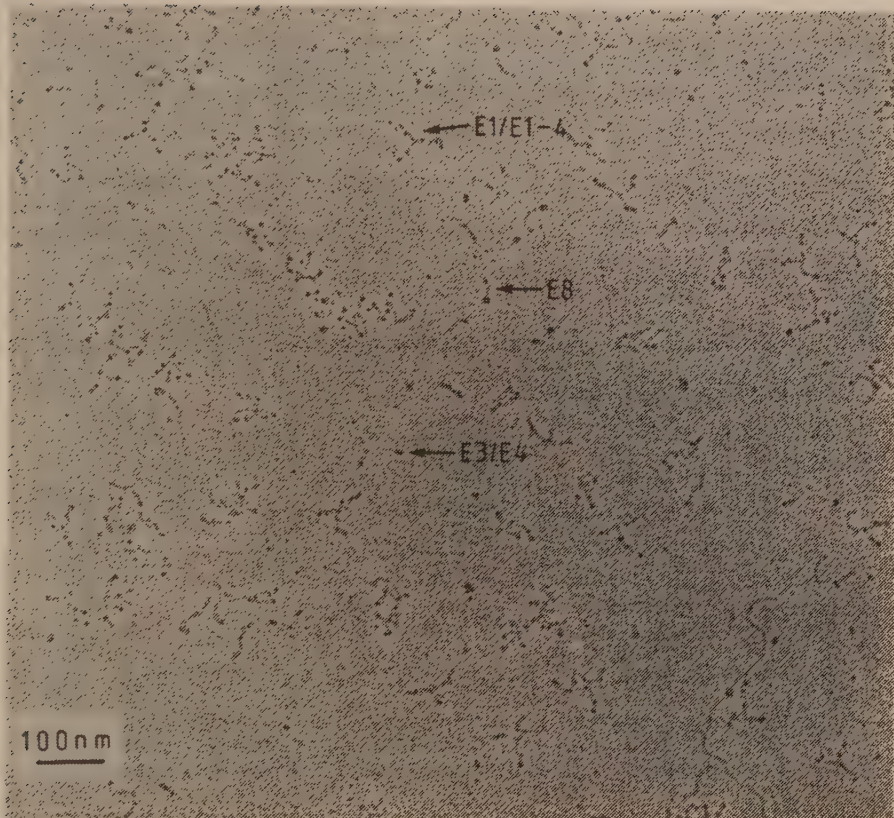


Abb. 4:

EM-Aufnahme einer limitierten, tryptischen Lamininspaltung. Es sind Fragmente zu erkennen, die E1-4, E1, E8, E4, oder E3 entsprechen (vgl. Texterklärung).

Vergößerung 1:120000

Spaltungsbedingungen: Trypsin- zu Lamininverhältnis 1:200 w/w, 6 h, 21°C.

Der Spaltungsansatz wurde anschließend wiederum elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht (Abb. 4). Auf dem elektronenmikroskopischen Bild lassen sich die tryptischen Lamininfragmente gut erkennen; in Analogie zu den Elastasefragmenten (vgl. Abb. 3) sind sie ebenfalls als

"E"-Fragmente bezeichnet. Insbesondere ist das stäbchenförmige E8 mit einer globulären Domäne am Ende nachweisbar. Außerdem erkennt man weitere globuläre Domänen, die wahrscheinlich als E4 aus den kurzen Lamininarmen oder als E3 aus E8 bzw. dem langen Arm stammen (E3/E4 in Abb. 4). Ungespaltenes oder leicht gespaltenes Laminin liegt neben E1 bzw. E1-4 (E1/E1-4 in Abb. 4) ebenso vor.

Das Lamininfragment E8 sollte nunmehr effizient aus dem Spaltungsgemisch gereinigt werden.

4.2.1.2. Reinigung des tryptischen Lamininfragmentes E8

Aufgrund der molekularen Größenunterschiede von E1/E1-4 und E8 wurde erwartet, daß das größere E1/E1-4 vor E8 auf Gelfiltration eluiert wird (vgl. Abb. 4). Zur Reinigung des E8-Fragmentes wurde das Spaltungsgemisch durch HPLC-Gelfiltration unter nicht-denaturierenden Elutionsbedingungen chromatographiert (Abb. 5). Von den Fraktionen F43 und F47 (Abb. 5) wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt (F43 in Abb. 6 und F47 in Abb. 7). In Abb. 6 erkennt man neben E1/E1-4 auch E8-Fragmente. In Abb. 7 liegt E8 schon weitgehend gereinigt vor; es sind kaum noch Kontaminationen an E1/E1-4 oder an weiteren Degradationsprodukten vorhanden.

Weitere Reinigungsversuche des Fragmentes E8 (2. Peak in Abb. 5) aus dem tryptischen Spaltungsansatz zeigten jedoch, daß eine Trennung von E1 bzw. E1-4 (1. Peak in Abb. 5) nicht

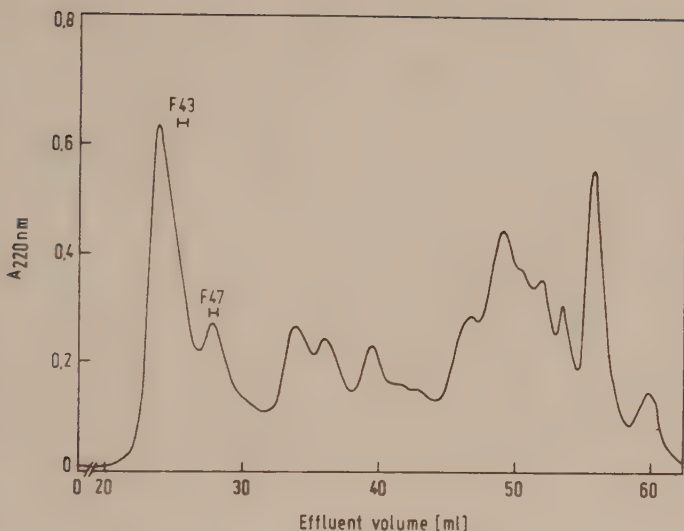


Abb. 5:

HPLC-Gelfiltration einer limitierten, tryptischen Lamininspaltung (6 h, 1:200 w/w, 21°C) auf TSK 4000 und TSK 3000 in Tandemanordnung (siehe Texterklärung). Die Chromatographie erfolgte unter nicht-denaturierenden Elutionsbedingungen. Von den Fraktionen F43 und F47 wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen hergestellt (siehe Abb. 6 und 7).

Elutionsbedingungen:

HPLC:	HPLC-System II (isokratisch)
Vorsäule:	TSK GSWP (7,5 x 75 mm)
Säulen in tandem:	1.) TSK 4000 (7,5 x 600 mm)
	2.) TSK 3000 (7,5 x 600 mm)
Elutionspuffer:	0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 % TFA
Elutionsfluß:	0,15 ml/min
Fraktionsvolumen:	0,6 ml
Absorption:	220 nm

konstant gewährleistet werden konnte. E8 wurde nur noch unzureichend von E1 abgetrennt. Unter den genannten Spaltungsbedingungen neigt das Fragment E8 zur Selbstaggregation und zur Aggregation an E1 bzw. E1-4. Eine Erhöhung

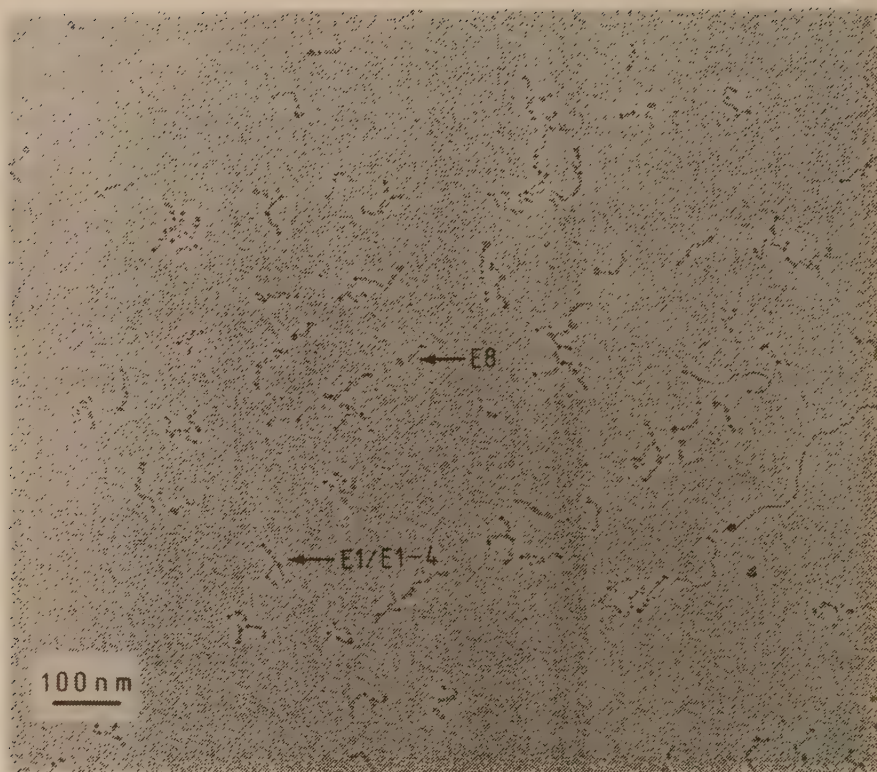


Abb. 6:

EM-Aufnahme einer limitierten, tryptischen Lamininspaltung nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 4000 und TSK 3000 von Fraktion 43 (siehe Abb. 5). Es sind hauptsächlich Lamininfragmente zu erkennen, die E1-4 und E1 entsprechen (siehe Texterklärung).

Vergrößerung: 1:120000

Spaltungsbedingungen: wie in Abb. 4 und 5 angegeben.

der Ionenstärke zur besseren Abtrennung von E8 wurde aufgrund der Denaturierung des Fragmentes vermieden.

Zweitens wurde versucht E8 aus dem Spaltungsgemisch durch Heparin-Sepharose zu trennen. Es wurde erwartet das E8 aufgrund seiner Bindungsstelle an Heparin-Sepharose von den anderen Fragmenten getrennt werden konnte. Jedoch bindet

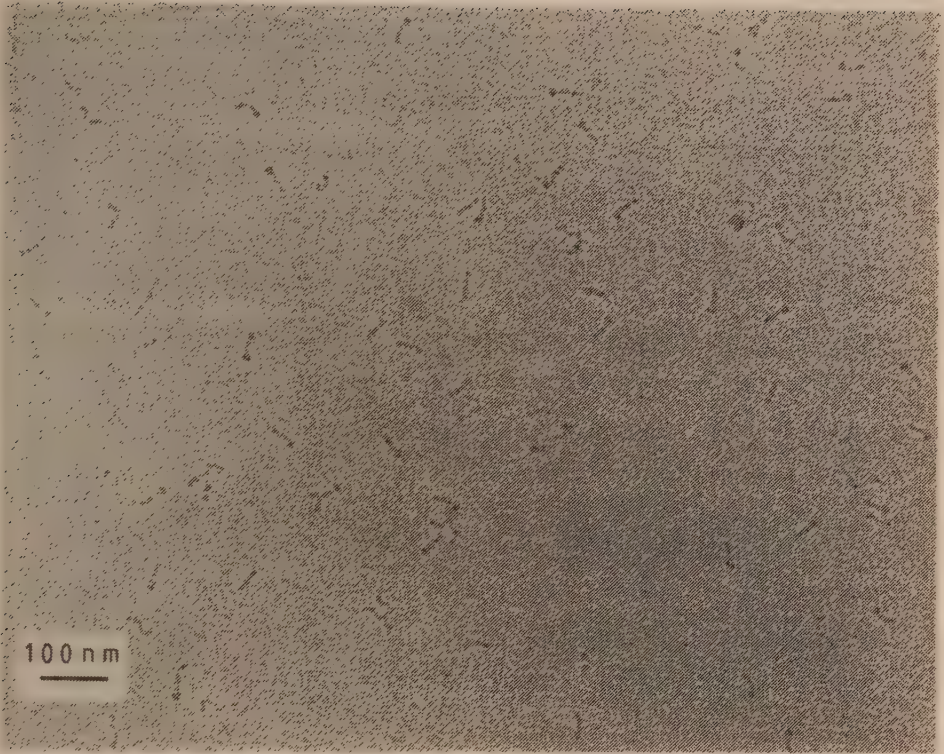


Abb. 7:

EM-Aufnahme einer limitierten, tryptischen Lamininspaltung nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 4000 und TSK 3000 von Fraktion 47 (siehe Abb. 5). Es ist hauptsächlich das Lamininfragment E8 zu erkennen (siehe Texterklärung).

Vergrößerung: 1:120000

Spaltungsbedingungen: wie in Abb. 4 und 5 angegeben.

auch das Fragment E1-4 noch schwach an Heparin-Sepharose, so daß auch hierdurch keine Trennung erzielt werden konnte. Außerdem fällt E1-4 im Verhältnis zu E8 in so hohen Ausbeuten an, daß die Bindungskapazität der Heparin-Sepharose weitestgehend von E1-4 belegt wird.

4.2.1.3. Proteolyse mit Elastase und E8-Reinigung

Das Problem der unzureichenden Abtrennung des Fragmentes E8 von E1 bzw. E1-4 wurde durch limitierte Proteolyse des Laminins mit Elastase gelöst. In einem analytischen Vorversuch wurden 150 mg Laminin in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat mit Elastase (Enzym:Substratverhältnis 1:100 w/w) bei 37°C limitiert gespalten. Die Reaktion wurde nach 30 min mit dem Proteaseinhibitor PMSF beendet. Der Reaktionsansatz wurde nach Dialyse in 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat auf Heparin-Sepharose aufgetragen.

An Heparin-Sepharose binden neben E1-4 mit schwacher Bindung (s.o.) in erster Linie die Lamininfragmente E8 und E3, während E1 und E4 nicht binden und im Durchfluß auftreten. Durch die Affinitätschromatographie wird daher der proteolytische Ansatz weitgehend von E1 und geringfügig von E1-4 befreit. Da das Fragment E1-4 nach Elastasespaltung in geringeren Ausbeuten anzufallen scheint, kann E8 durch Heparin-Sepharose von E1 bzw. E1-4 getrennt werden.

Ein weiterer Vorteil der Affinitätschromatographie besteht in der erheblichen Verringerung des Volumens; eine Lyophilisation mit anschließender Applikation auf HPLC-Gelfiltration wird erleichtert.

Das Eluat der Heparin-Sepharose wurde anschließend durch HPLC-Gelfiltration aufgetrennt (Abb. 8). Die Fraktionen F48 und F49 wurden elektronenmikroskopisch analysiert (Abb. 9). Vergleicht man die Chromatogramme in Abb. 5 und Abb. 8 so

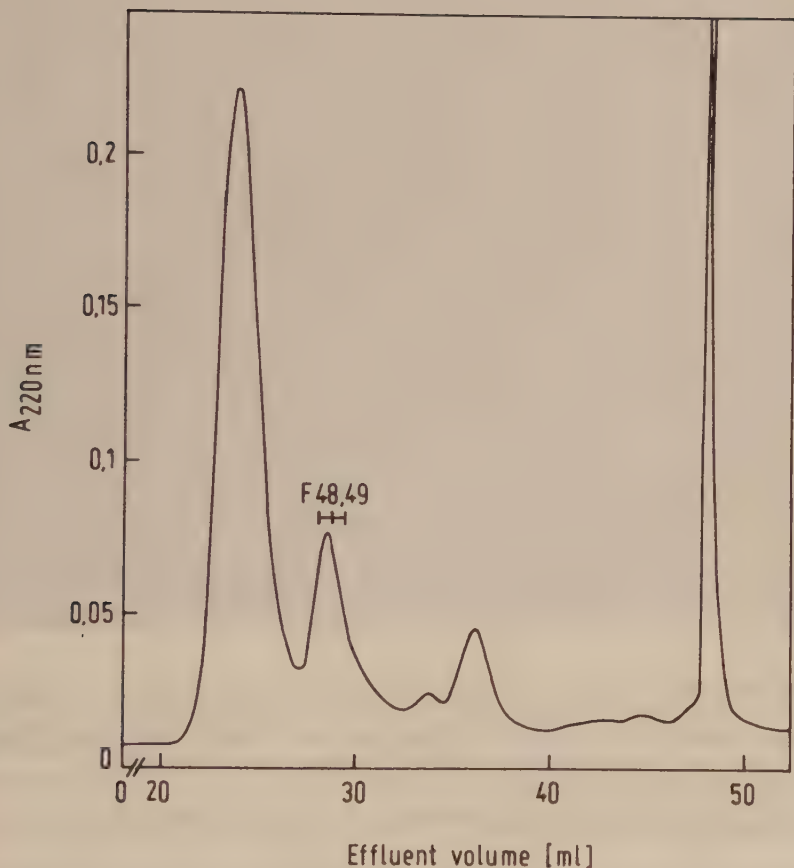


Abb. 8:

HPLC-Gelfiltration einer limitierten Elastase-Spaltung (30 min, 1:100 w/w, 37°C) von Laminin auf TSK 4000 und TSK 3000 in Tandemanordnung. Die Chromatographie erfolgte unter nicht-denaturierenden Elutionsbedingungen.

Von den vereinigten Fraktionen F48 und F49 wurde eine EM-Aufnahme hergestellt (siehe Abb. 9).

Elutionsbedingungen: wie in Abb. 5 angegeben.

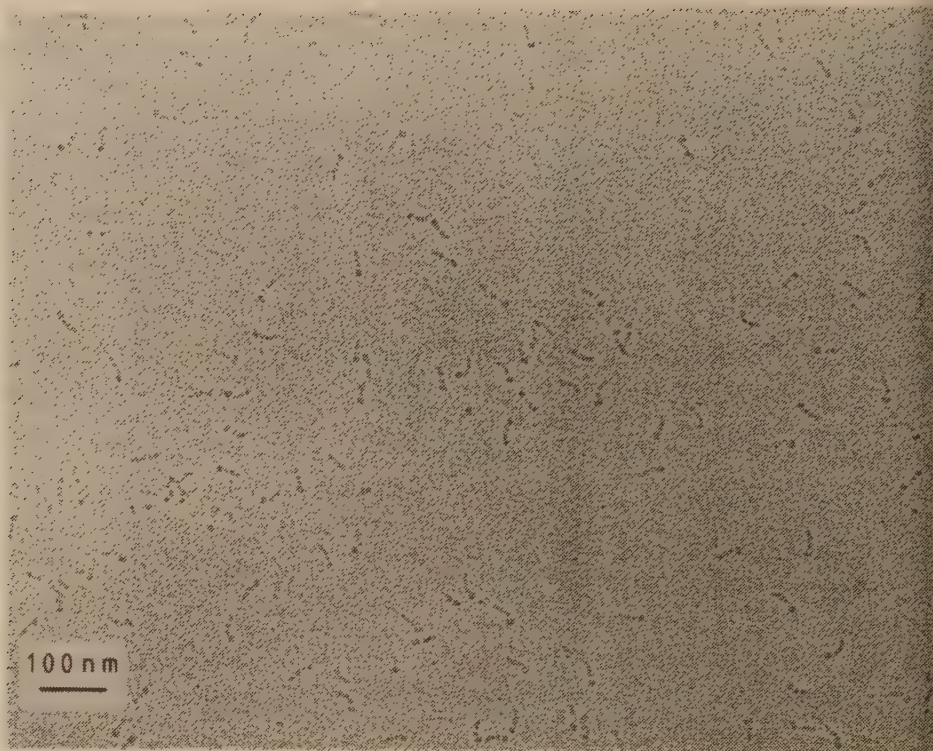


Abb. 9:

EM-Aufnahme einer limitierten Elastase-Spaltung von Laminin nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 4000 und TSK 3000 von den Fraktionen F48 und F49 (siehe Abb. 8). Das Lamininfragment E8 ist von den anderen Lamininfragmenten abgetrennt.

Vergrößerung 1:120000

Spaltungsbedingungen: Elastase- zu Lamininverhältnis (1:100 w/w, 30 min, 37°C).

erkennt man, daß sich das Fragment E8 (2. Peak im Chromatogramm) wesentlich besser von E1 bzw. E1-4 (1. Peak) abtrennen läßt. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das E8 aus der limitierten Elastasespaltung in der Regel verkürzt ist und/oder weniger zur Aggregation neigt als das aus der tryptischen Spaltung gewonnene. Außerdem sind die Fragmente E1 und E1-4 durch die vorangegangene Heparin-Sephrose weitgehend abgetrennt worden.

4.2.2. Präparative Versuche

Für die präparative Reinigung des Lamininfragmentes E8 wurde in Anlehnung an die analytischen Vorversuche (siehe Kap. 4.2.1.) eine präparative Reinigungsmethode entwickelt.

4.2.2.1. Proteolyse mit Elastase

Für präparative Ansätze wurde aus dem EHS-Tumor gereinigtes Laminin in einer Konzentration von 0,5 bis 1 mg/ml aus dem Aufbewahrungspuffer gegen 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat dialysiert. Ein präparativer Spaltungsansatz bestand in der Regel aus 1 l Lamininlösung, zu 4 mal 250 ml portioniert. Die limitierte Proteolyse wurde bei 37°C mit Elastase in der Verdünnung 1:100 (w/w) durchgeführt. Die Lamininspaltung wurde mit dem Proteaseinhibitor PMSF nach 16 h beendet.

Nach 16-stündiger Lamininspaltung ist die Abtrennung des Fragmentes E8 ebenso wie nach der 30-minütigen Spaltung gewährleistet (vgl. Abb. 8 und Abb. 10). Außerdem konnte durch Erhöhung der Spaltungszeit die Ausbeute der kleineren Fragmente E4 und E3, die ebenfalls proteinchemisch charakterisiert wurden, verbessert werden.

4.2.2.2. Trennung der Elastase-Fragmente auf Agarose

Das Volumen konnte nach der Spaltung durch Druckfiltration auf etwa 25 % des Ausgangsvolumens also 250 ml verringert werden. Die präparative Trennung der Lamininfrag-

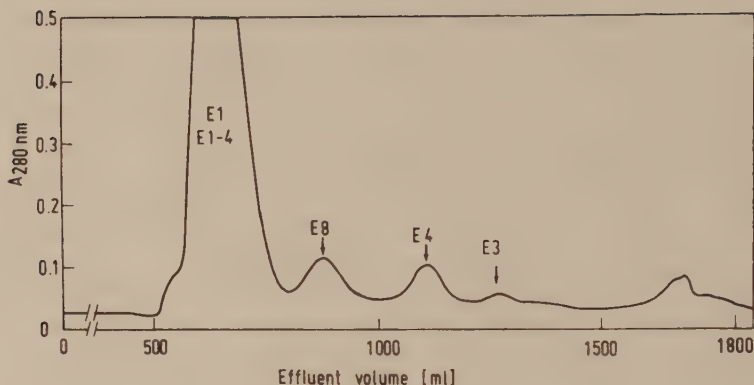


Abb.10:

Trennung der Lamininfragmente (E1 bzw. E1-4, E8, E4, E3) nach limitierter Elastase-Spaltung (16 h, 1:100 w/w, 37°C) auf Agarose 1,5m.

Elutionsbedingungen:

Säule: Agarose 1,5m (4 x 140 cm)
 Elutionspuffer: 0,05 M Tris/HCl pH 7,4
 0,2 M NaCl
 0,02 % (w/v) NaN_3
 jeweils 10 $\mu\text{l/ml}$ PMSF und CMBS

Auftragsvolumen: 50 ml

Fluß: 52 ml/h (Perpex Peristaltic-Pumpe)

Fraktionsvolumen: 13 ml

Fraktionszeit: 15 min

Absorption: 280 nm

mente (E1 bzw. E1-4, E8, E4, E3) erfolgte auf Agarose (siehe Kap. 3.4.1.); das Chromatogramm und die Elutionsbedingungen sind in Abb. 10 wiedergegeben. Das Auftragsvolumen betrug 50 ml. Aus dem Chromatogramm in Abb. 10 kann man entnehmen, daß die Fragmente hinreichend getrennt sind. Als analytische Kontrolle der Trennung diente neben EM-Aufnahmen die Disk-SDS-PAGE (Abb. 11).

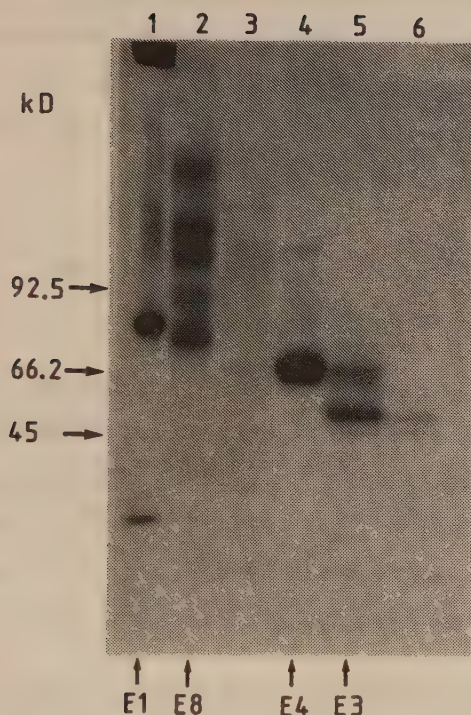


Abb. 11:

Disk-SDS-PAGE der Lamininfragmente (E1 bzw. E1-4, E8, E4, E3) nach limitierter Proteolyse mit Elastase (1:100 v/w, 37°C, 16 h) und präparativer Trennung auf Agarose 1,5m (siehe Abb. 10).

Sammelgel: 2,5 % Acrylamid

Trenngel: 3-25 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Coomassiefärbung

Für den Auftrag wurden Aliquots mit jeweils 1 ml Eluat in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat lyophilisiert und in 40 µl Probenpuffer aufgenommen.

Spur 1: 15 µl; E1 bzw. E1-4

Spur 2: 20 µl; E8 (Hauptbanden: 140kD, 120kD, 80 kD, 70kD)

Spur 3: 30 µl; Pool zwischen E8 und E4

Spur 4: 20 µl; E4 (70 kD)

Spur 5: 30 µl; E3 (50 kD) mit E4

Spur 6: 30 µl; Pool des flachen Peaks hinter E3

Die Begrenzung des Auftragsvolumens erforderte außerdem mehrere Agaroseläufe zur Trennung eines Spaltungsansatzes. Die einzelnen Fraktionen wurden, den Peaks der Fragmente entsprechend, in Pools gesammelt. Der Pool des Fragmentes E8 betrug schließlich etwa 500 ml.

4.2.2.3. Reinigung des Elastase-Fragmentes E8 auf Heparin-Sepharose

Zur weiteren Reinigung des Lamininfragmentes E8 ließ sich seine Affinitätsbindung an Heparin-Sepharose ausnutzen. Der E8-Pool (2. Peak in Abb. 10) wurde im Auftragspuffer auf eine Heparin-Sepharose appliziert (Abb. 12). Die Elution fand bereits mit geringer Ionenstärke in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat, allerdings stark verzögert, statt (Abb. 12).

Standardmäßig wurde der Elution mit 0,5 M NaCl der Vorzug gegeben; das Elutionsvolumen konnte wegen beschleunigter Elution auf etwa 10 % verringert werden (Abb. 14).

Aliquots der E8-Lösung wurden vor und nach der Reinigung auf Heparin-Sepharose durch Disk-SDS-PAGE unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert. In Abb. 13 und Abb. 15 sind die Disk-SDS-PAGE zu den E8-Reinigungen auf Heparin-Sepharose nach Elution mit 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat oder 0,5 M NaCl wiedergegeben.

Abb. 13 zeigt in Spur 1 den proteinfreien Durchfluß, in Spur 2 das an Heparin-Sepharose gebundene E8-Fragment das mit 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat eluiert wurde. Die

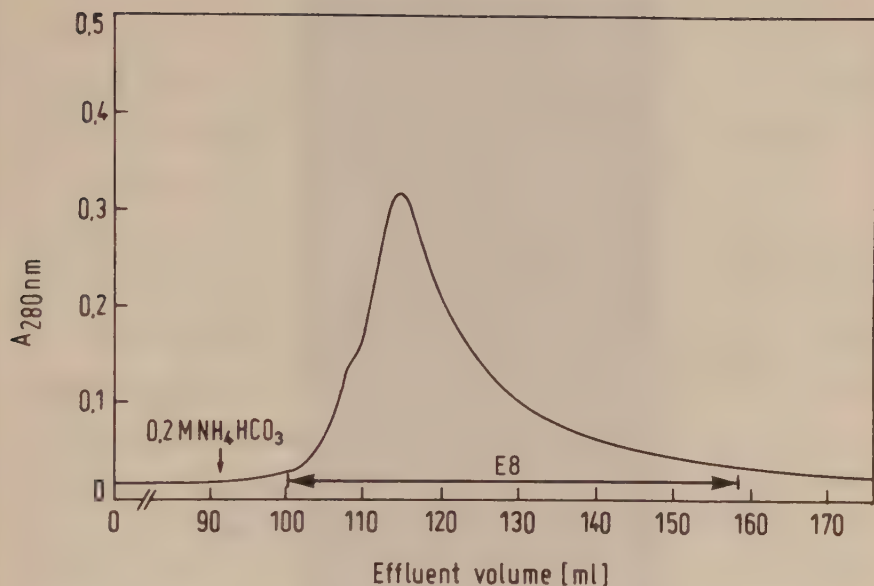


Abb. 12:

Affinitätschromatographie des Lamininfragmentes E8 auf Heparin-Sepharose CL-6B eluiert mit $0,2 \text{ M}$ Ammoniumhydrogencarbonat.

Elutionsbedingungen:

Säule: Heparin-Sepharose CL-6B (2,6 x 11 cm)
 Fluß: 32 ml/h
 Auftragsvolumen: 600 ml
 Auftragspuffer: $0,05 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ bei 4°C
 Vorlaufpuffer: $0,05 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ bei RT
 Elutionspuffer: $0,2 \text{ M NH}_4\text{HCO}_3$ bei RT
 Fraktionszeit: 10 min
 Fraktionsvolumen: 5 ml
 Absorption: 280 nm

Aliquots sind unter nicht-reduzierenden (- ME) und unter reduzierenden Bedingungen (+ ME, 5 % v/v Mercaptoethanol) aufgetragen. Die Gelelektrophorese zeigt, daß E8 schon durch die vorangegangene Trennung auf Agarose weitgehend gereinigt war.

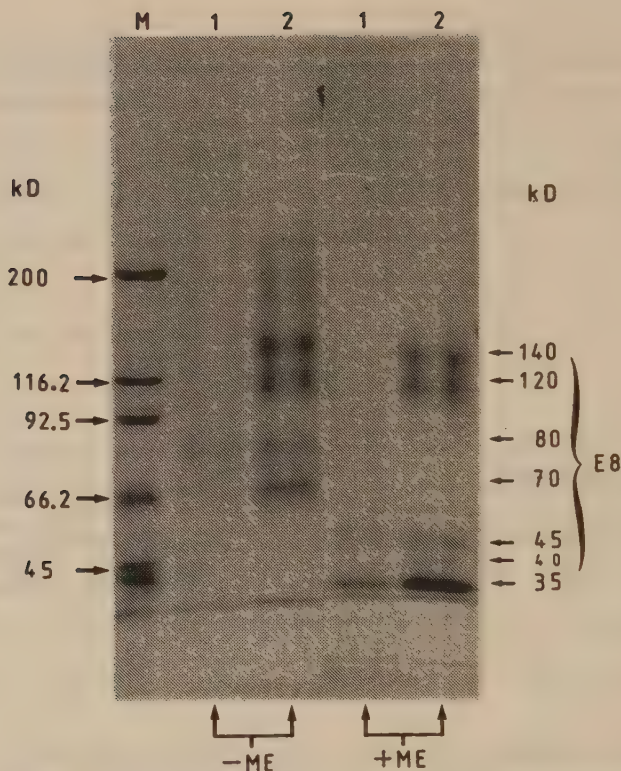


Abb. 13:

Disk-SDS-PAGE des Lamininfragmentes E8 nach Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose CL-6B (siehe Abb. 12).

In Spur 1 wurde der nicht-bindende Durchfluß, in Spur 2 das an Heparin-Sepharose bindende Lamininfragment E8 aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden (- ME) und reduzierenden (+ ME, 5 % v/v Mercaptoethanol) Bedingungen.

Unter nicht-reduzierenden Bedingungen besteht E8 aus den Hauptbanden bei 140, 120, 80 und 70 kD. Unter reduzierenden Bedingungen gehen die Banden bei 80 und 70 kD in eine deutliche Bande bei 35 kD, eine schwache Bande bei 45 kD und eine sehr schwache Bande bei 40 kD über.

Sammelgel: 2,5 % Acrylamid

Trenngel: 3-20 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 15 h

Detektion: Coomassiefärbung

Spur M: hochmolekularer Proteinstandard

Spur 1: Durchfluß ohne E8-Banden

Spur 2: Eluat mit E8-Banden

Allerdings erfolgte die Trennung des Fragmentes E8 von E1 nicht immer vollständig, zumal die Agarose im präparativen Maßstab bis an die Grenze der Trennkapazität benutzt werden mußte. Der E8-Pool ist demzufolge noch geringfügig mit E1 verunreinigt (Abb. 15, Spur 1).

Nach Affinitätschromatographie des E8-Pools befindet sich E1, als obere Doppelbande bei etwa 300-450 kD (Abb. 15, Spur 2, -ME) erkennbar, ausschließlich im Durchfluß. Nach Reduktion (+ ME) geht diese Doppelbande in mehrere, kaum wahrnehmbare Banden über (Abb. 15, Spur 2, +ME).

Das gereinigte Fragment E8, mit seinen charakteristischen vier Hauptbanden, konnte nach Affinitätsbindung an Heparin-Sepharose lediglich im Eluat nachgewiesen werden (Abb. 15, Spur 3).

Das an Heparin-Sepharose gebundene Fragment E8 besteht nach Disk-SDS-PAGE aus vier Hauptbanden, die bei 140 kD, 120 kD, 80 kD und 70 kD liegen. Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen des Eluats wurde eindeutig nachgewiesen, daß das gereinigte Fragment E8 vorlag (Daten nicht gezeigt, vgl. Abb. 9). Unter reduzierenden Bedingungen bleiben lediglich die beiden Hauptbanden bei 140 kD und 120 kD erhalten. Die Banden bei 80 kD und 70 kD gehen nach Reduktion in eine kräftig hervortretende Bande bei 35 kD und eine schwächer in Erscheinung tretende 45 kD Bande sowie eine sehr schwache Bande bei 40 kD über (Abb. 13).

Durch Western-Blot wurde gezeigt, daß die nicht-reduzierbaren Banden bei 140 kD bzw. 120 kD aus der A-Kette stammen,

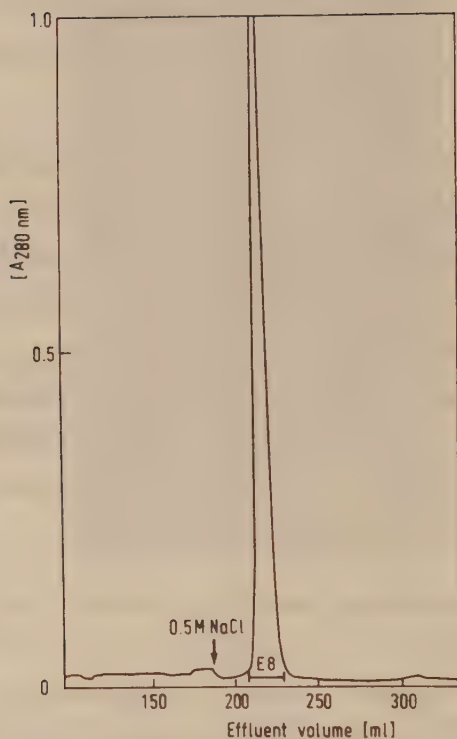


Abb. 14:

Affinitätschromatographie des Lamininfragmentes E8 auf Heparin-Sepharose CL-6B eluiert mit 0,5 M NaCl.

Elutionsbedingungen:

Säule: Heparin Sepharose CL-6B (2,8 x 7cm)

Fluß: 53 ml/h (Perpex Peristaltic-Pumpe)

Auftragsvolumen: 570 ml

Auftragspuffer: 0,05 M NH_4HCO_3 bei 4°C

Vorlaufpuffer: 0,05 M NH_4HCO_3 bei RT

Elutionspuffer: 0,5 M NaCl bei RT

Fraktionszeit: 10 min

Fraktionsvolumen: 9 ml

Absorption: 280 nm

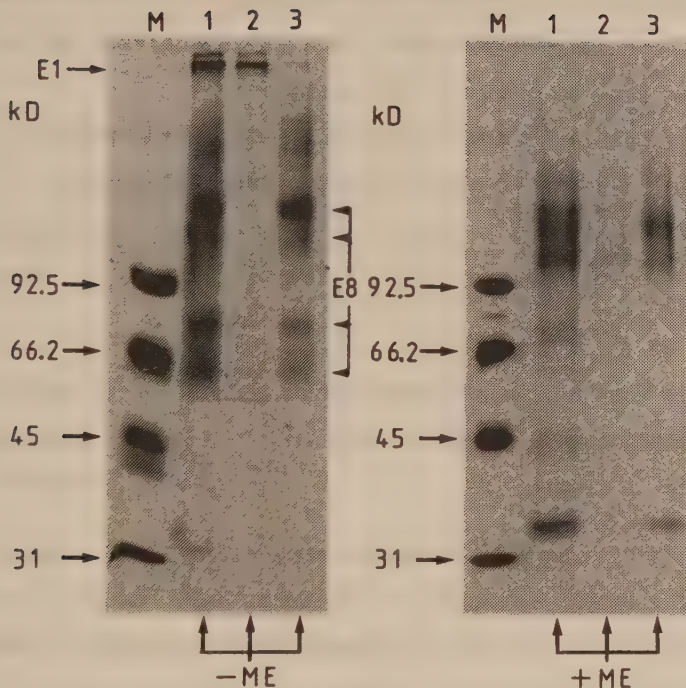


Abb. 15:

Disk-SDS-PAGE der Affinitätschromatographie des Lamininfragmentes E8 auf Heparin-Sepharose CL-6B (siehe Abb. 14) nach Trennung auf Agarose 1,5 m (Abb. 10) unter nicht-reduzierenden (- ME) und reduzierenden Bedingungen (+ ME).

Sammelgel: 2,5 %

Trenngel: 5-20 % (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Teil A/B, Spur M: niedrigmolekularer Proteinstandard

Teil A, Spur 1-3: ohne Mercaptoethanol (- ME)

Teil B, Spur 1-3: mit 5 % (v/v) Mercaptoethanol (+ ME)

Spur 1: E8-Pool vor Heparin-Sepharose (vgl. Abb. 10)

Spur 2: Durchfluß mit E1-Fragment

Spur 3: Eluat mit E8-Fragment

da sie vornehmlich mit anti-E3-Antikörpern reagierten. Die reduzierbaren Banden bei 80 kD und 70 kD stellen C-terminale Abschnitte der B-Ketten dar, da sie mit anti-25k-Antikörpern markiert wurden (Daten nicht gezeigt).

Die anti-E3-Antikörper fanden hierbei als Indikator für die A-Kette, die anti-25k-Antikörper wurden als Nachweis für die B1- und B2-Ketten aus Laminin verwendet. Die Begründung für diese Nachweisfunktion der Antikörper lautet im wesentlichen:

- (1) E3 kann aufgrund seiner globulären Struktur und seiner Lokalisation im Lamininmolekül nur eine Teilstruktur der A-Kette sein.
- (2) Das 25k-Fragment stellt die C-terminalen Anteile der leichten Lamininketten B1 und B2 dar, die durch eine nahe am C-Terminus liegende Disulfidbrücke verbunden sind (Barlow et al., 1984; Paulsson et al., 1985).

Die eindeutigen proteinchemischen Beweise, daß E8 aus den C-terminalen Anteilen der A-, B1- und B2-Ketten besteht, werden noch ausführlich dargestellt (Kap. 4.4. und 4.5.).

Zusammenfassend konnte eine Reinigung des Fragmentes E8 im präparativen Maßstab standardmäßig etabliert werden. Dies geschieht durch Trennung des limitierten Spaltungsansatzes auf Agarose mit anschließender Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose. Die Reinigung des Lamininfragmentes E3 erfolgt nach dem gleichen Schema.

4.3. Limitierte Proteolyse des Lamininfragmentes E8 und Charakterisierung der E8-Subfragmente

4.3.1. Tryptische Proteolyse des E8 in Subfragmente

Für subtilere, strukturelle Untersuchungen des Lamininfragmentes E8 mit proteinchemischen Methoden war es notwendig, E8 in noch kleinere, definierte Subfragmente zu spalten. Hierbei sollte die räumliche Struktur der E8-Subfragmente so weit wie möglich erhalten bleiben, um Aussagen über die Domänenorganisation des Lamininfragmentes E8 zu erhalten.

Nach Reinigung des Lamininfragmentes E8 durch Agarose und Heparin-Sepharose von den übrigen Elastasefragmenten, liegen aus einem präparativen Spaltungsansatz 50 ml E8-Lösung in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat vor (siehe Kap. 4.2.2.).

Zunächst wurden in einem Vorversuch nur 10 ml (etwa 5 mg) E8 mit 25 µg Trypsin bei 37°C gespalten. Die limitierte Proteolyse, bei der das Verhältnis Trypsin zu E8 1:200 (w/w) betrug, wurde nach 16 h mit Proteaseinhibitor PMSF beendet. Das Spaltungsgemisch wurde durch HPLC-Gelfiltration chromatographiert; das Chromatogramm ist mit den Elutionsbedingungen in Abb. 16 wiedergegeben.

Aus E8 entstehen nach limitierter, tryptischer Spaltung fünf Fraktionen, die im folgenden als Subfragmente "S1" bis "S5" bezeichnet sind (Abb. 16). Außer den tryptischen

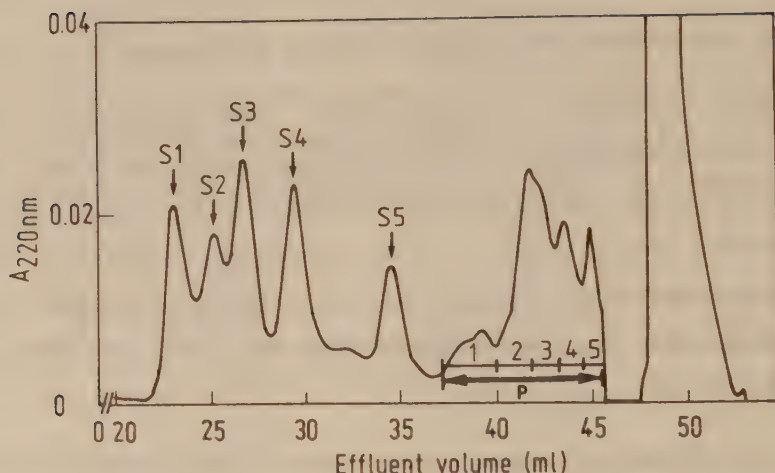


Abb. 16:

Analytische HPLC-Gelfiltration einer limitierten, tryptischen Spaltung (16 h, 37°C, 1:200) des Lamininfragmentes E8 auf zwei TSK 2000 in tandem.

Die Peaks der tryptischen E8-Subfragmente sind mit "S1" bis "S5" bezeichnet. Die tryptischen Peptide wurden in den Fraktionen "P1" bis "P5" gesammelt.

Elutionsbedingungen:

HPLC: HPLC-System II (isokratisch)

Auftrag: 1 ml (etwa 0,5 mg Protein)

Vorsäule: TSK GSWP (7,5 x 75 mm)

Säulen in tandem: 1.) TSK 2000 (7,5 x 600 mm)

2.) TSK 2000 (7,5 x 600 mm)

Elutionspuffer: 0,2 M Ammoniumacetat, 0,1 % TFA

Fluß: 0,15 ml/min

Fraktionsvolumen: 0,6 ml

Absorption: 220 nm

Subfragmenten S1 bis S5 entstehen niedermolekulare E8-Peptide, die vor dem Salzpeak eluieren; die Fraktionen sind von "P1" bis "P5" durchnummeriert (Abb. 16).

Die Subfragmente S1 bis S5 wurden vor der detaillierten proteinchemischen Analyse (Kap. 4.4.) elektronenmikroskopisch mit rotary shadowing Verfahren (Kap. 4.3.2.) und auf Disk-SDS-PAGE (Kap. 4.3.3.) mit anschließendem Western-Blot (4.3.4.) analysiert.

4.3.2. Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Elektronenmikroskopie

Die Subfragmente S1 und S5 aus Fraktionen der Peakmaxima (Abb. 16) wurden elektronenmikroskopisch (rotary shadowing) sichtbar gemacht. Die EM-Aufnahmen sind in Abb. 17 bis 21 wiedergegeben.

Das Subfragment S1 (Abb. 17) ähnelt morphologisch weitgehend dem nativen Fragment E8. Jedoch ist in einigen Fällen im Vergleich zum E8 die endständige, globuläre Domäne, die in der Regel aus drei Subdomänen besteht (Paulsson et al., 1985), verkleinert und/oder die stäbchenförmige Domäne verkürzt.

Beim Subfragment S2 (Abb. 18) ist ebenfalls noch ansatzweise die hantelförmige Struktur des Fragmentes E8 erkennbar. Allerdings ist hier die stäbchenförmige Domäne deutlicher verkürzt.

Beim Subfragment S3 (Abb. 19) tritt die Degradation des

Lamininfragmentes E8 durch die limitierte tryptische Proteolyse nunmehr immer deutlicher hervor. Die stäbchenförmige Domäne ist aufgrund ihrer weitgehenden Verkleinerung kaum noch von der globulären Domäne unterscheidbar.

In Abb. 20 erkennt man das Subfragment S4 in erster Linie als globuläre Domäne. Oftmals sind zusätzlich dünne, fadenförmige Strukturen erkennbar.

Abb. 21 zeigt das Subfragment S5 als globuläre Subdomäne, die allerdings kleiner als die endständige, globuläre Gesamtdomäne des Lamininfragmentes E8 aussieht.

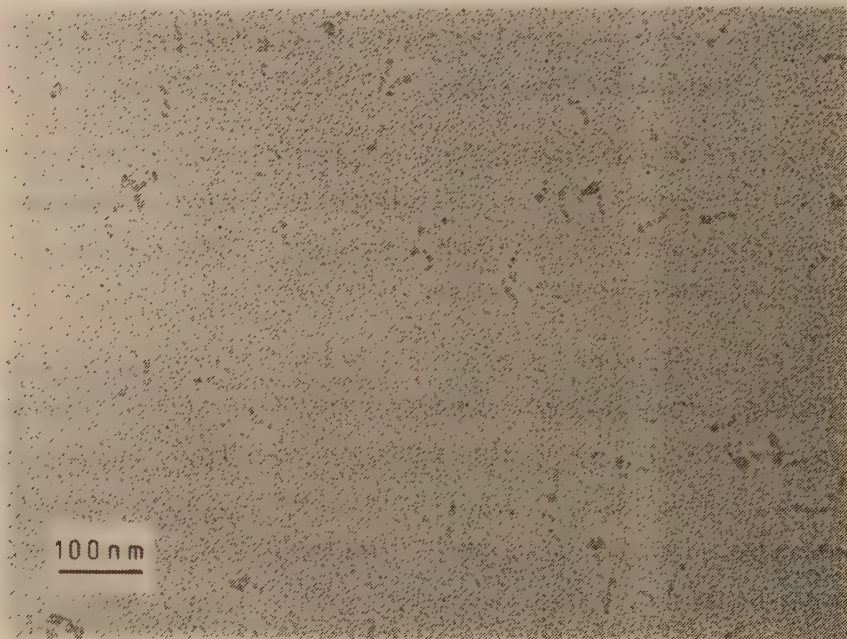


Abb. 17:

EM-Aufnahme des E8-Subfragmentes S1 nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 2000 (siehe Abb. 16, 24 und Texterklärung).
Vergrößerung 1:150000



Abb. 18:
EM-Aufnahme des E8-Subfragmentes S2 nach HPLC-Gelfiltration
auf TSK 2000 (siehe Abb. 16, 24 und Texterklärung).
Vergrößerung 1:150000



Abb. 19:
EM-Aufnahme des E8-Subfragmentes S3 nach HPLC-Gelfiltration
auf TSK 2000 (siehe Abb. 16, 24 und Texterklärung).
Vergrößerung 1:150000

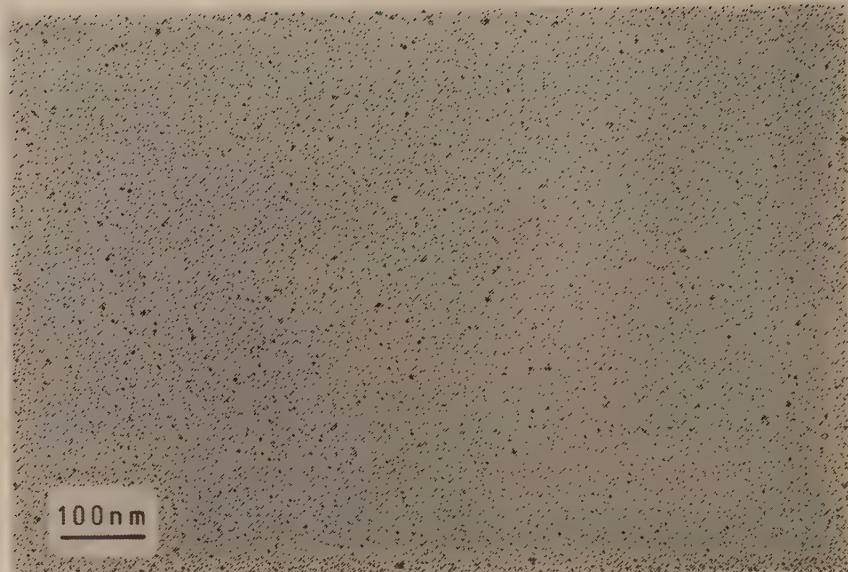


Abb. 20:
EM-Aufnahme des E8-Subfragmentes S4 nach HPLC-Gelfiltration
auf TSK 2000 (siehe Abb. 16, 24 und Texterklärung).
Vergrößerung 1:15000

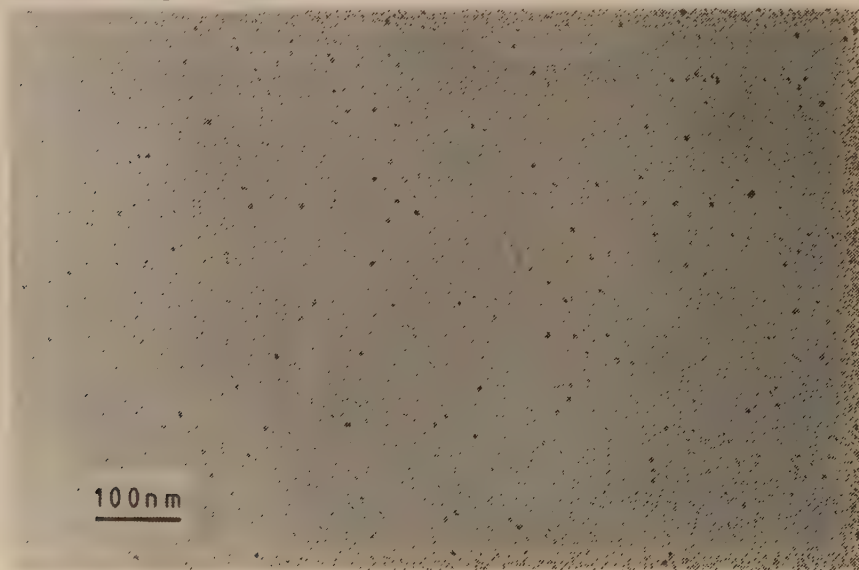


Abb. 21:
EM-Aufnahme des E8-Subfragmentes S5 nach HPLC-Gelfiltration
auf TSK 2000 (siehe Abb. 16, 24 und Texterklärung).
Vergrößerung 1:150000

Obwohl die elektronenmikroskopischen Aufnahmen lediglich ein grobes Bild der räumlichen Strukturen erkennen lassen, wird deutlich, daß sich das Lamininfragment E8 durch limitierte, tryptische Proteolyse stufenweise degradieren läßt. Es entsteht insbesondere die globuläre Domäne S5, die proteinchemisch gut untersucht werden konnte (siehe Kap. 4.4.2. und 4.5.1.).

4.3.3. Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Disk-SDS-PAGE

Während die elektronenmikroskopische Aufnahme ein Abbild der räumlichen Proteinstruktur wiedergibt, lassen sich durch Disk-SDS-PAGE die E8-Subfragmente S1 bis S5 in nicht-nativem bzw. denaturiertem Zustand als Banden darstellen. Die Gelelektrophorese gestattet aufgrund des Bandenmusters Aussagen, ob ein oder mehrere Peptide in den einzelnen Subfragmenten vorhanden sind. Sie liefert das Entscheidungskriterium, ob weitere Peptidtrennungen für die nachfolgende Sequenzanalyse erforderlich sind.

Die Fraktionen der Subfragmente S1 bis S5 und die niedermolekularen Peptide der Fraktionen P1 bis P5 wurden auf Disk-SDS-PAGE analysiert; der Nachweis der Proteinbanden erfolgte wegen der vorausgehenden Trennung im analytischen Maßstab (Abb. 16) mit Silberfärbung.

In Abb. 22 sind die Subfragmente S1 bis S5 in den Spuren 1 bis 5 aufgetragen. Die Proben der niedermolekularen

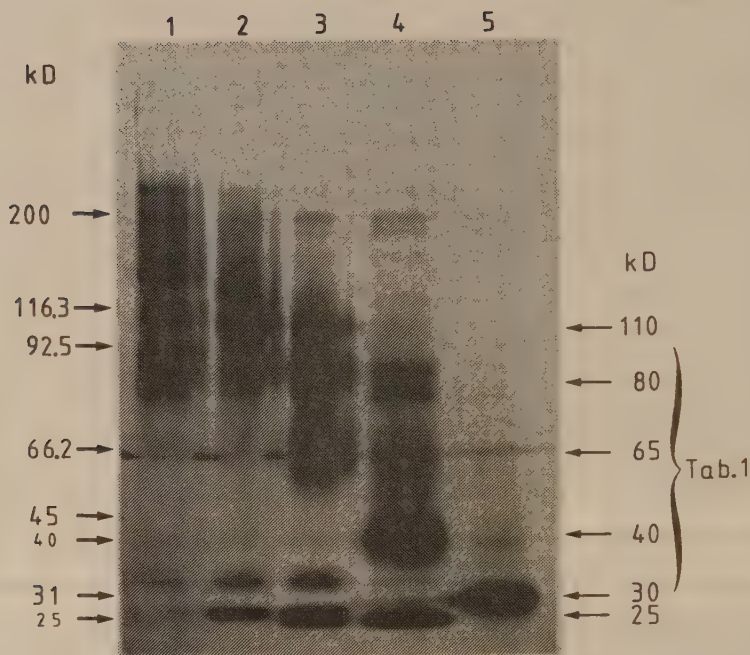


Abb. 22:

Disk-SDS-PAGE der tryptischen E8-Subfragmente S1 bis S5 nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 2000 (siehe Abb. 16).

Die Fraktionen der Peaks S1 bis S5 wurden vereinigt (weitere Erklärung im Text und in Tab. 1).

Trenngel: 2,5 % Acrylamid

Sammelgel: 3-20 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Silberfärbung

Auftrag: in Spuren 1-5 die Subfragmente S1-S5

E8-Peptide aus den Fraktionen P (vgl. Abb. 16) ergaben keine distinkten Banden. In Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man deutlich die von S1 bis S5 zunehmende Degradation der tryptischen E8-Subfragmente, die als Kaskade im Bandenmuster sichtbar wird.

Zur besseren Übersicht sind die Hauptbanden der Subfragmente S1 bis S5 mit Molekulargewichten in Tab. 1 aufgelistet:

S1	S2	S3	S4	S5
diffus	110 kD	110 kD		
	80 kD	80 kD	80 kD	
		65 kD	65 kD	
			40 kD	
	35 kD	35 kD		
	o25kD ¹⁾	o25 kD ¹⁾		30 kD
		u25 kD ²⁾	u25 kD ²⁾	

Tab. 1: Hauptbanden der E8-Subfragmente S1 bis S5, die in der Disk-SDS-PAGE (Abb. 23) aufgetrennt wurden.

Anmerkung: 1) obere 25 kD-Bande

2) untere 25 kD-Bande

4.3.4. Charakterisierung der E8-Subfragmente durch Western-Blot

Für den Western-Blot der E8-Subfragmente S1 bis S5 (Abb. 23) wurden anti-E3-Antikörper und anti-25k-Antikörper verwendet, die freundlicherweise von Herrn Dr. Timpl zur Verfügung gestellt worden waren. Die anti-E3-Antikörper sind gegen Epitope des Lamininfragmentes E3 gerichtet; die anti-25k-Antikörper markieren das aus dem EHS-Tumor isolierte 25k-Fragment (Paulsson et al., 1985). Während anti-E3-Antikörper mit einer am C-terminalen Ende gelegenen, globulären Domäne der A-Kette reagieren, können anti-25k-Antikörper als immunologischer Indikator der C-terminalen Anteile der leichten B1- und B2-Ketten dienen (vgl. Kap. 4.2.2.3.).

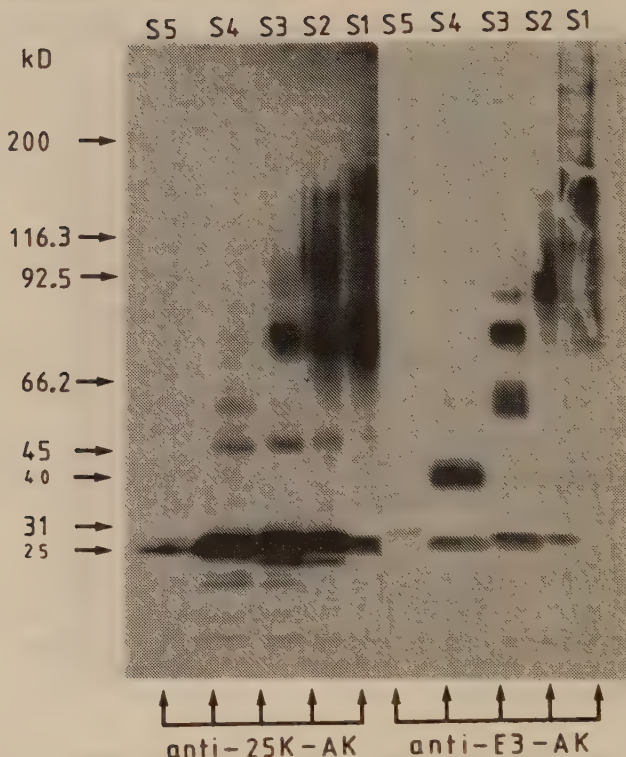


Abb. 23:

Western-Blot der tryptischen E8-Subfragmente S1 bis S5 nach HPLC-Gelfiltration auf TSK 2000 (siehe Abb. 16) und Disk-SDS-PAGE wie in Abb. 23 angegeben.

Der Nachweis der Antikörperreaktion erfolgte nach Bildung des Peroxidase-Anti-Peroxidase Komplexes; im linken Bildteil wurden anti-25k-Antikörper, im rechten Bildteil anti-E3-Antikörper verwendet (weitere Erklärungen im Text).

Die Subfragmente S1 bis S5 wurden unter gleichen Bedingungen, wie in Abb. 22 angegeben, durch Disk-SDS-PAGE aufgetrennt. Der Nachweis der positiven Antikörperreaktion fand nach Ausbildung der Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)-Komplexe statt (siehe Kap. 3.5.1.2.).

Der Western-Blot der Subfragmente S5 bis S1 ist mit den anti-25k-Antikörpern im linken Teil der Abb. 23 und mit den anti-E3-Antikörpern im rechten Teil der Abb. 23 jeweils in den Spuren 1 bis 5 wiedergegeben.

Alle Fraktionen bis auf S5 zeigen mehr und weniger komplexe Anfärbemuster.

Die 30 kD-Bande des Subfragmentes S5 läßt sich nur äußerst schwach mit anti-E3-Antikörpern markieren und färbt nicht mit anti-25k-Antikörpern an. Dieser immunologische Befund weist im Zusammenhang mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen (vgl. Kap. 4.3.2. und Abb. 22) darauf hin, daß S5 eine weitere globuläre Subdomäne des E8 darstellt. Durch proteinchemische Sequenzen kann unter Heranziehung von cDNA-Daten (Deutzmann und Huber, unveröffentl.) bestätigt werden, daß S5 eine Subdomäne der A-Kette darstellt, die vor der C-terminalen E3-Subdomäne liegt (vgl. Kap. 4.4.2. und Kap. 5.).

Lediglich die Subfragmente S2 bis S4 zeigen eine intensive Farbreaktion nach der anti-25k-Antikörpermarkierung; dies stellt den immunologischen Hinweis für die strukturelle Beteiligung des 25k-Fragmentes am Lamininfragment E8 dar.

Das Subfragment S4 enthält nach den immunologischen Befunden (Abb. 23):

- (1) das 25k-Fragment, den C-terminalen Anteilen der leichten Lamininketten und

(2) einen Teil der A-Kette (40 kD Fragment), als positive Bande der anti-E3-Antikörperreaktion.

Dieser Befund konnte nach Trennung der Fragmente durch proteinchemische Sequenzanalyse bestätigt werden (siehe Kap. 4.4.3.).

4.4. Proteinchemische Analyse der tryptischen Proteolyseprodukte des Lamininfragmentes E8

Die E8-Subfragmente S1 bis S5 sowie die niedermolekularen Peptide aus den Fraktionen P1 bis P5 (siehe Abb. 16) wurden proteinchemisch durch Sequenzanalyse untersucht.

Bekannt sind C-terminale Proteinsequenzen der B1- und B2-Kette (Barlow et al., 1984) und Partialsequenzen der A-Kette (Yamada, Y., et al., unveröffentl.), die aus cDNA-Sequenzen abgeleitet wurden. Außerdem liegen Partialsequenzen der A-Kette vor, die durch proteinchemische Sequenzanalyse ermittelt wurden (Deutzmann, R. und Huber, H., unveröffentl.).

Es sollten proteinchemisch Teilsequenzen von einzelnen E8-Subfragmenten ermittelt werden, um

- 1.) einzelne Proteinfragmente den Lamininketten zuzuordnen,
- 2.) bessere Einsichten in die Domänenorganisation zu erhalten und

3.) den Verlauf der Ketten im Gesamtmolekül zu klären (vgl. Kap. 5.).

Zur Gewinnung von ausreichendem Ausgangsmaterial für die Proteinsequenzierung wurden die Subfragmente S1 und S5 und die tryptischen Peptide aus E8 im präparativen Maßstab aufgearbeitet. Die limitierte, tryptische Proteolyse des Fragmentes E8 erfolgte präparativ unter den gleichen Bedingungen, wie im analytischen Maßstab beschrieben (siehe Kap. 4.3.1.).

50 ml gereinigtes E8 wurde in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat mit Trypsin im Verhältnis 1:200 (w/w) 16 h bei 37°C gespalten; die Proteolyse wurde mit 1,2 mg Proteaseinhibitor PMSF beendet.

Die präparative Trennung erfolgte unter den gleichen Elutionsbedingungen wie die analytische Chromatographie (vgl. Abb. 16 in Kap. 4.3.1.) in fünf HPLC-Läufe. Ein präparativer Lauf ist exemplarisch in Abb. 24 wiedergegeben.

Die Fraktionen aller präparativen Läufe wurden nach den Peaks S1 bis S5 vereinigt; die niedermolekularen Peptide wurden als Fraktionen P1 bis P5 gesammelt (Abb. 24). Die Endkonzentration des Elutionspuffers wurde mit Ammoniumhydrogencarbonat auf 0,1 M gebracht, um eine gute Löslichkeit des lyophilisierten Materials vor der Sequenzanalyse zu gewährleisten.

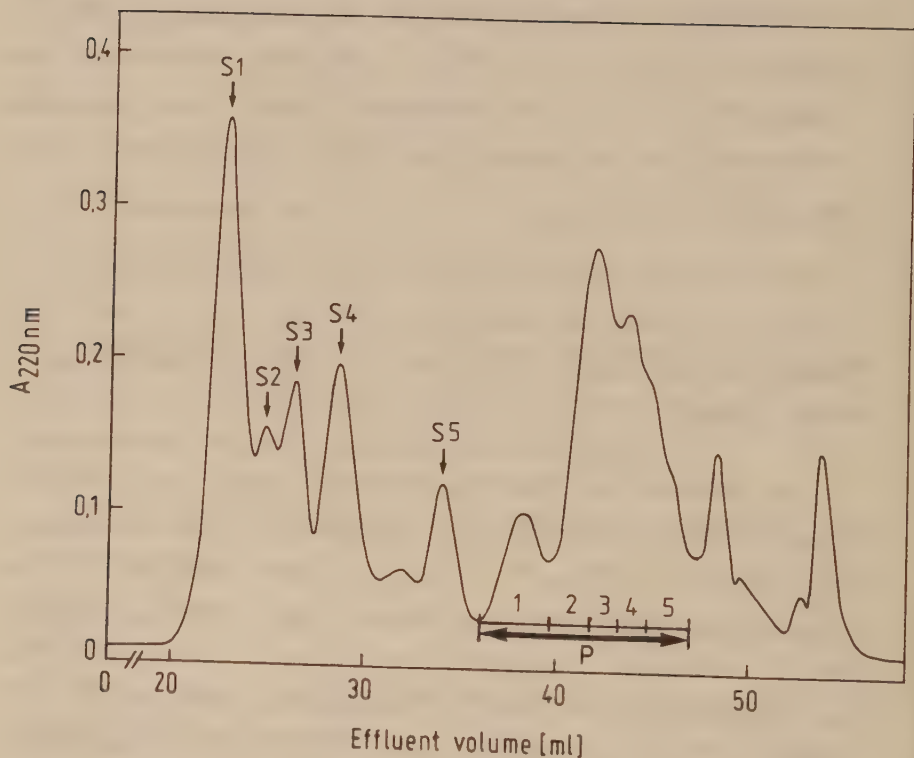


Abb. 24:
 Präparative HPLC-Gelfiltration einer limitierten, tryptischen Spaltung (16 h, 37°C, 1:200) des Lamininfragmentes E8 auf TSK 2000 in tandem.
 Die Peaks der tryptischen E8-Subfragmente sind mit "S1" bis "S5" bezeichnet. Die tryptischen Peptide wurden in den Fraktionen "P1" bis "P5" gesammelt (vgl. Abb. 16 mit analytischer Chromatographie).
 Elutionsbedingungen:
 Auftrag: 1 ml (etwa 5 mg Protein)
 ansonsten wie in Abb. 16 angegeben.

4.4.1. Sequenzanalyse der niedermolekularen E8-Peptide

Zur Sequenzanalyse wurden die niedermolekularen Peptide der Fraktionen P jeweils reduziert und alkyliert, um Disulfidbrücken zu spalten.

Die Trennungen der reduzierten und alkylierten Peptide wurden durch Umkehrphasenchromatographie auf HPLC durchgeführt (Abb. 25 und 26).

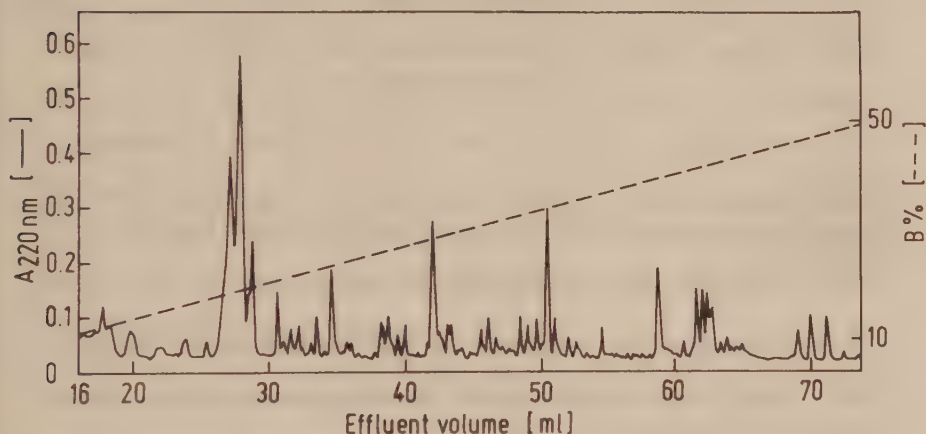


Abb. 25:

Umkehrphasenchromatographie tryptischer E8-Peptide aus Fraktion P2 (siehe Abb. 24) auf Vydac C18 mit Acetonitril-Gradient.

Elutionsbedingungen:

HPLC:	HPLC-System III (Gradient)
Auftrag:	0,5 ml
Säule:	C18 Vydac (4,6 x 250 mm)
Temperatur:	55°C
Elutionspuffer: A:	0,1 % (v/v) TFA
B:	0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) MeCN
Gradient: Anfang:	100 % A, 0 % B
in 75 min:	50 % A, 50 % B
Fluß:	1 ml/min
Absorption:	220 nm

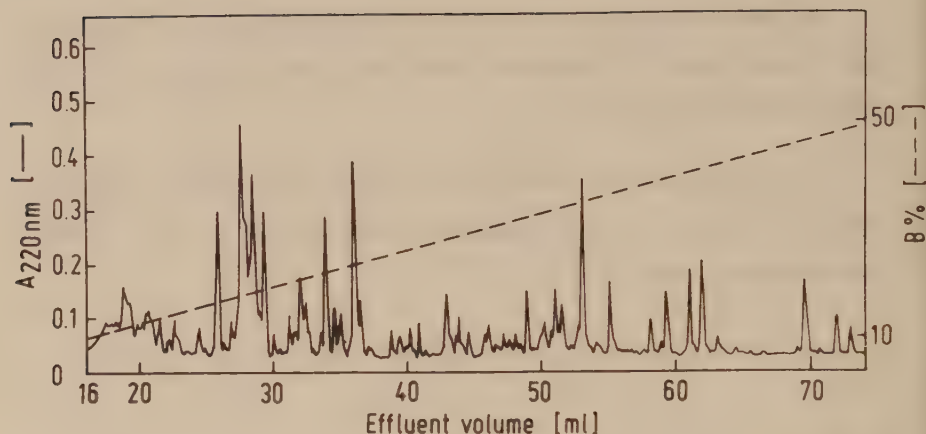


Abb. 26:
Umkehrphasenchromatographie tryptischer E8-Peptide aus
Fraktion P3 (siehe Abb. 24) auf Vydac C18 mit Acetonitril-
Gradient.
Elutionsbedingungen: wie in Abb. 25 angegeben.

Die Chromatographien fanden auf einer C18-Säule (Vydac) statt. Die niedermolekularen Peptide wurden mit einem Acetonitril-Gradienten eluiert.

Exemplarisch sind in Abb. 25 und 26 zwei HPLC-Läufe der Fraktionen P2 und P3 dargestellt, aus denen die detaillierten Trennbedingungen zu entnehmen sind.

Die Peptide wurden peakweise fraktioniert; das Elutionsvolumen betrug in der Regel etwa 0,5 ml. Alle Peptide, deren Peaks hinreichend getrennt waren und eine Absorption größer als 0,15 (vgl. Abb. 25 und 26) aufwiesen, wurden sequenziert; pro Peptid standen 1 bis 4 nmol zur Verfügung.

Aufgrund ihrer Primärstruktur wurden die Peptide den bekannten Sequenzdaten (Barlow et al., 1984) zugeordnet. Insgesamt konnten neun Peptide durch Edman-Abbau eindeutig charakterisiert werden (Abb. 27A und 27B). Während drei Peptide aus der A-Kette stammen (Abb. 27B, Sequenzen 1 bis 3), konnten sechs Peptide aus den C-terminalen Bereichen der B1- und B2-Kette identifiziert werden. Die Zuordnungen sind in Abb. 27A durch Einrahmen der sequenzierten Peptide wiedergegeben.

Die aus der cDNA abgeleitete Sequenz der B1-Kette konnte in Pos. 401 vervollständigt werden. Der in Klammern angegebene, hypothetische Cysteinrest "(C)" wurde aufgrund der proteinchemischen Sequenzanalyse als Glycin nachgewiesen (vgl. Abb. 27). Dieses Ergebnis ist von struktureller Bedeutung, da an der genannten Position die Existenz einer Disulfidbrücke ausgeschlossen ist.

Aus den proteinchemischen Daten folgt unmittelbar, daß die C-terminalen Abschnitte der B1- und B2-Ketten im Lamininfragment E8 liegen müssen (siehe Kap. 5.). Die exakte Position der N-Termini der leichten Ketten im E8 wurde durch N-terminale Sequenzanalyse nach Kettentrennung bestimmt (siehe Kap. 4.5.3.1.).

Neben den Peptiden, die aus den leichten Lamininketten stammen, konnten auch Peptide aus der A-Kette sequenziert und identifiziert werden. Die Sequenzdaten der tryptischen Peptide, die sich in den Fraktionen P (siehe Abb. 24) befanden, sind in Abb. 27B wiedergegeben. Die Zuordnung der

A. ← HEPTAD →
d e l g a b c d e l g a b c d e l g a b c d e l g a b c

REPEAT 1	A I N R T I A E A N E K T R E	15
2	A Q L A L G H A A D A T E A N K A H E A E R I A S A	43
3	V Q K N A T S T K A D A E R T F G E V T D L D N E V N G	71
4	N L R Q L E E R E N E L K K K O D D A D Q D M H A G M	99
5	A S Q A A Q E A E L N A R K A K N S V S S E L S Q L N N L L D Q	131
6	L G O L D T V D L N K L N E E G S L N K A K D E K K A S D	161
7	L D R K V S D L E S E A R K Q E A A I M D Y N R N I A E	189
8	I I K D I H N L E D I K K T L P T G C F N T P S I E K P	217

B. ← HEPTAD →
a b c d e l g a b c d e l g a b c d e l g a b c d e l g

REPEAT 1	G E V T V A N S A W Q K A N D F R D V L S A L A E	166
2	V E D L S K M V S E A K V R A D E A K Q N A Q D V L L K	194
3	T N A T K E K V D K S N E D L R N L I K Q I R N F L T E	222
4	D S A D L D S I E A V A N E V L K H E M P S T Q Q	248
5	L O N L T E D I R E R V E T L S O V E V I L G Q S A A D	276
6	T A R A E L L L E E A K R A S K S A T D V K V T	300
7	A D M V K E A L E E A E K A Q V A A E K A I N G A D E D	328
8	I D G T O N L L T S I E S E T A A S E E T L T N A S Q R	356
9	I S K L E R N V E E L K N A A A W N S G E A E Y I E N V	384
10	V Y S V K O N A D D V K K T L D K E L D E N Y A L V E S L	413
11	I A R K T E E S A D A R R K A E L L Q N E A K T L L A Q	441
12	A N S K L O L L E D L E R K Y E N N Q K Y L E D K A Q E	469
13	L V R E E G E V R S L L K D I S E K V A V Y S T C L	495

Abb. 27A:

Aminosäuresequenzen der C-terminalen Bereiche der B2- (A.) und B1- (B.) Kette (Barlow et al., 1984). Sechs der durch Edman-Abbau charakterisierten und der B1- bzw. B2-Kette zugeordneten Peptide sind eingerahmt.

- (1) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10 -11 -12
D - L - I - Y - V - G - G - L - P - H - X - K
- (2) 1 - 2 - 3 ...
A - Y - Q
- (3) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10 -11
E - a - s - A - A - E - N - P - p - V - R

Abb. 27B:

Die Partialsequenzen (1)-(3) stammen aus der A-Kette. (1) wurde als Partialsequenz aus der A-Kette von Huber, H. 1986 identifiziert. (2) als partielle cDNA-Sequenz der A-Kette (Yamada, Y. et al., unveröffentl.). (3) ist keine Sequenz aus den B-Ketten.

Sequenzen erfolgte aufgrund von Partialsequenzen niedermolekularer Peptide aus der gelelektrophoretisch gereinigten A-Kette (Huber, H., 1986). Demnach stammen die in Abb. 27B vorliegenden Sequenzen aus dem Abschnitt der A-Kette, der an der Struktur des Lamininfragmentes E8 beteiligt ist (vgl. Kap. 5.).

Die in Abb. 27B aufgeführten Sequenzen konnten für die Synthese eines Oligonukleotides nicht verwendet werden, da die Rückübersetzung des genetischen Codes für die beteiligten Aminosäuren eine hohe Degeneration ergibt. Dennoch sind die Proteinsequenzen für die Identifizierung des Leserasters bei der Sequenzierung der klonierten DNA-Fragmente von Bedeutung (Deutzmann, R. und Huber, H., unveröffentl.).

4.4.2. Sequenzanalyse des E8-Subfragmentes S5

Im folgenden werden die experimentellen Daten zum Subfragment S5 zusammengefaßt, die durch Sequenzanalyse anschließend bestätigt oder erweitert wurden:

- (1) Das 30 kD große Subfragment S5 konnte nach limitierter, tryptischer Proteolyse aus dem Lamininfragment E8 gewonnen werden (siehe Kap. 4.3., Abb. 24). Da nach Reduktion das Molekulargewicht von 30 kD erhalten bleibt, besteht S5 nur aus einer Peptidkette (Abb. 22 und Tab. 1).

(2) Obwohl sich S5 nicht mit anti-E3-Antikörpern im WesternBlot nachweisen läßt (vgl. Abb. 23) wurde aufgrund der nicht-reduzierbaren Bande bei 30 kD und der globulären Erscheinungsform im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 21) erwartet, daß S5 eine globuläre E8-Subdomäne darstellt und der A-Kette angehört.

Um möglichst umfangreiche Informationen über die Primärstruktur zu erhalten, wurde S5 tryptisch gespalten; die tryptischen Peptide wurden nach Trennung durch Umkehrphasenchromatographie der automatischen Sequenzanalyse unterworfen.

Experimentell wurde folgendermaßen vorgegangen: Das Subfragment S5 (vgl. Kap. 4.2.) wurde mit DTE reduziert und anschließend mit Jodacetat alkyliert (Methode: Kap. 3.4.). Um Materialverluste durch Entsalzung zu vermeiden, wurde die tryptische Spaltung in verdünntem Reduktionspuffer durchgeführt, in dem die enzymatische Aktivität der Protease erhalten bleibt (0,3 M Guanidiniumchlorid mit pH 9).

Die tryptische Spaltung erfolgte durch 70 µg Trypsin bei 37°C. Die Proteolyse wurde nach 24 h durch Hinzugabe des Proteaseinhibitors PMSF beendet. Danach wurden die S5-Peptide durch Umkehrphasenchromatographie auf einer C18-Säule aufgetrennt (Abb. 28). Die Peptidfraktionen wurden nach Trennleistung und Peakgröße (Absorption größer als 0,01 in Abb. 28) im Chromatogramm selektioniert und sequenziert.

Sechs Sequenzen tryptischer Peptide des E8-Subfragmentes S5 sind in Abb. 29 aufgelistet. Erwartungsgemäß wurden keine

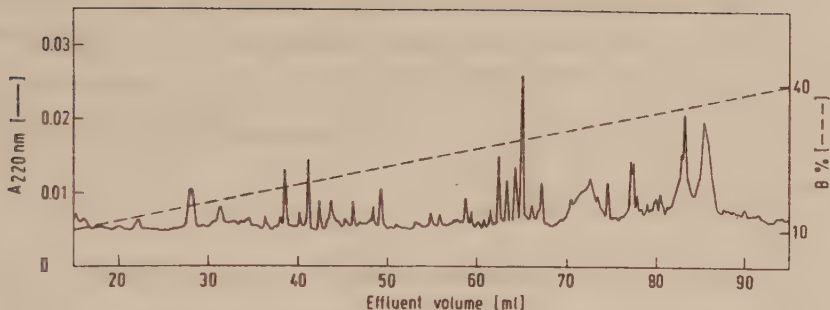


Abb. 28:

Umkehrphasenchromatographie tryptischer Peptide aus dem E8-Subfragment S5 (siehe Abb. 24) auf Vydac C18 mit Acetonitril-Gradient.

Elutionsbedingungen:

Auftrag: 460 μ l

Gradient: Anfang 95 % A, 5 % B

nach 5 min 95 % A, 5 % B

nach 105 min 45 % A, 55 % B

ansonsten wie in Abb. 25 angegeben.

Sequenzen aus der B1- und B2-Kette gefunden. Aus der ersten Sequenz in Abb. 29 konnte die Partialsequenz Asp-Gly-Gln-Glu-His nach Rückübersetzung des genetischen Codes für Oligonukleotidsynthesen verwendet werden. Da S5 nach den proteinchemischen Befunden höchstwahrscheinlich aus der A-Kette stammt, sollte mit Hilfe des abgeleiteten Oligonukleotidgemisches ein cDNA-Klon der A-Kette identifiziert werden (Deutzmann et al., unveröffentl.).

Proteinchemische Sequenzanalysen der A-Kette waren außerdem für die Identifizierung des korrekten Leserasters hilfreich.

- (1) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10
 A - L - L - H - A - P - T - G - s - Y
 11 -12 -13 -14 -15 -16 -17 -18 -19 -20
s - D - G - Q - E - H - x - I - x - L
- (2) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10 -11 -12
 K - G - C - A - L - E - P - I - Q - X - V - L
- (3) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7
 S - Y - V - G - C - I - K
- (4) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8
 T - s - F - s - G - C - I - K
- (5) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10 -11
 X - X - G - T - x - Y - P - D - x - l - k
- (6) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10
 L G E D N I N V V E
 r V I T I Q V D x N
 11 -12 -13
 G N E
 s m

Abb. 29:

Sequenzanalyse tryptischer Peptide aus dem E8-Subfragment S5.

Das Subfragment S5 stellt eine Subdomäne der A-Kette dar, da keine B-Kettensequenzen gefunden werden konnten. Aus der unterstrichenen Partialsequenz in (1) konnte ein Oligonukleotid abgeleitet werden, mit dem cDNA des C-terminalen Teils der A-Kette identifiziert wurde (siehe Texterklärung).

Sequenz (2) wurde als N-terminale Sequenz des Subfragmentes S5 identifiziert (siehe Kap. 4.4.1.).

Die Sequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben (Großbuchstabe: eindeutig, Kleinbuchstabe: nicht eindeutig und x: nicht identifiziert); bei (6) handelt es sich um eine Doppelsequenz.

Nach Vorlage der kompletten cDNA-Sequenz des identifizierten Klons konnte die Anordnung des Subfragmentes S5 durch Vergleich der Protein- und DNA-Sequenzen bestimmt werden (siehe Kap. 5.).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Subfragment S5 eine unter den Bedingungen der limitierten, tryptischen Proteolyse resistente Domäne des Lamininfragmentes E8 darstellt. Die 30 kD große Domäne wird durch einen Teil der Primärstruktur der A-Kette gebildet, der nahe am C-terminalen Ende gelegen ist.

4.4.3. Sequenzanalyse des E8-Subfragmentes S4

Das E8-Subfragment S4 (vgl. Abb. 24) besteht nach Disk-SDS-PAGE aus sieben Proteinbanden (siehe Abb. 22 und Tab. 1). Im Western-Blot reagiert die 25 kD-Bande als C-terminaler Teil der B-Ketten mit anti-25k-Antikörpern; die 40 kD-Bande läßt sich als A-Kettenabschnitt mit anti-E3-Antikörpern nachweisen (Abb. 23). Nach Reduktion mit Mercaptoethanol geht die 25 kD-Bande in eine Doppelbande die bei 12,5 kD liegt über, während die 40 kD-Bande unter reduzierenden Bedingungen erhalten bleibt (Abb. 34, Spuren 6 und 7).

Zur näheren Charakterisierung des 40 kD- und 25 kD-Fragmentes wurde eine chromatographische Trennung unter denaturierenden Bedingungen ausgearbeitet. Das 40 kD- und 25 kD-Fragment, die in 0,2 M Ammoniumacetat noch zusammen in Pool S4 chromatographierten (Tab. 1) konnten erst nach Reduktion und Alkylierung unter denaturierenden Bedingungen (6 M Guanidiniumchlorid) getrennt werden (Abb. 30).

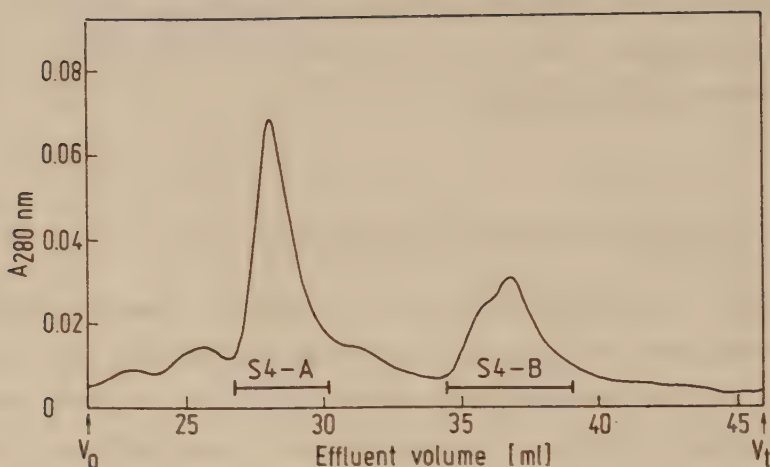


Abb. 30:

Trennung des E8-Subfragmentes S4 (siehe Abb. 24) in das 40 kD-Fragment (S4-A) und das 25 kD-Fragment (S4-B) unter denaturierenden Elutionsbedingungen nach Reduktion und Alkylierung.

Elutionsbedingungen:

HPLC:	HPLC-System I (isokratisch)
Auftrag:	650 μ l
Säulen in tandem:	1.) TSK 3000 (7,5 x 600 mm)
	2.) TSK 3000 (7,5 x 600 mm)
Elutionspuffer:	6 M Guanidiniumhydrochlorid,
	0,1 M Natriumacetat pH 6,6
Fluß:	0,2 ml/min
Fraktionsvolumen:	0,4 ml
Absorption:	280 nm

Durch den chaotropen Elutionspuffer wurde die Aggregationsfähigkeit der S4-Fragmente aufgehoben. Das 40 kD-Fragment befindet sich in Pool S4-A, das 25 kD-Fragment in S4-B.

Nach Entsalzung des 40 kD-Fragmentes auf C4 wurden Peptide mit 25 µg Trypsin (bei 37°C für 25 h) hergestellt und durch Umkehrphasenchromatographie auf C18-Säule aufgetrennt (Daten nicht gezeigt).

Durch die Sequenzanalyse des in Abb. 31 angegebenen Peptides, das eine Partialsequenz der A-Kette darstellt (Huber, H., 1986), konnte bewiesen werden, daß das 40 kD-Protein in Pool S4 Teil der Primärstruktur der A-Kette ist. Weitere Sequenzen sollten aus cDNA-Daten abgeleitet werden (Deutzmann, R. et al., unveröffentl.).

Ebenso wie für das 40 kD-Fragment beschrieben, wurden tryptische Peptide des 25 kD-Fragmentes isoliert. In der Sequenzanalyse konnten zwei Peptide aus den C-terminalen Enden der B1- und B2-Kette identifiziert werden (Abb. 31).

Zusammenfassend ergibt sich aus den immunologischen und proteinchemischen Daten eindeutig, daß das 40 kD-Fragment ein Abschnitt der A-Kette darstellt und das 25 kD-Fragment aus den C-terminalen Enden der B1- und B2-Ketten besteht (siehe Kap. 4.5.2. und Kap. 5.). Eine exakte Lokalisation des 40 kD-Fragmentes ist aufgrund der unvollständigen cDNA-Daten noch nicht möglich (siehe Kap. 5.).

4.4.4. Sequenzanalyse der E8-Subfragmente S2 und S3

Die E8-Subfragmente S2 und S3 zeigen nach Disk-SDS-PAGE ein komplexes Bandenmuster (Abb. 22 und Tab. 1). Auf dem Western blot sind Epitope der anti-25k-Antikörper sowie der anti-E3-Antikörper nachweisbar (Abb. 24).

Zunächst wurden die Pools S2 und S3 (siehe Abb. 24) reduziert und alkyliert. Die Umkehrphasenchromatographie der beiden Subfragmente auf einer C4-Säule ergab ein komplexes, aber ähnliches Peakmuster. Aufgrund dieses Ergebnisses wurden die beiden Pools S2 und S3 vereinigt und präparativ auf einer C4-Säule mit einem Acetonitrilgradienten eluiert. Aufgrund des komplexen Peakmusters wurde nur eine Fraktion mit hoher Absorption zur sequenzanalytischen Charakterisierung mit 20 µg Trypsin bei 37°C für 24 h gespalten. Die tryptischen Peptide wurden auf einer C18-Säule (Vydac) aufgetrennt. Durch Edman-Abbau einzelner Fraktionen konnten drei Peptide sequenziert werden.

Die Partialsequenzen sind in Abb. 32 wiedergegeben. Die beiden ersten Sequenzen konnten der A-Kette aufgrund von cDNA-Sequenzen (Yamada, Y., 1986, unveröfftl.) zugeordnet werden.

Die dritte Sequenz stammt nicht aus den B-Ketten; erst bei Vorlage der gesamten Sequenz der A-Kette ist zu erwarten, daß diese Sequenz identifiziert werden kann und alle drei Sequenzen exakt lokalisiert werden können.

- (1) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6
A - Y - Q - P - q - T
- (2) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10 -11
V - A - F - L - W - D - d - x - x - G - S
- (3) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10
T - Q - E - P - D - N - L - L - F - Y
- 11 -12 -13 -14 -15
L - G - S - S - S

Abb. 32:

Sequenzanalyse tryptischer Peptide aus den E8-Subfragmenten S2 und S3. Die Partialsequenzen (1) und (2) entstammen der A-Kette, (3) ist keine Sequenz aus den B-Ketten und kann erst bei Vorlage der kompletten A-Kettensequenz zugeordnet werden. Die Sequenzen sind im Ein-Buchstaben-Code angegeben (Großbuchstabe: eindeutig, Kleinbuchstabe: nicht eindeutig und x: nicht identifiziert).

4.4.5. Tryptische Nachspaltung des E8-Subfragmentes S1

Die elektronenmikroskopische Aufnahme (Abb. 17) zeigt, daß die Grundstruktur des Lamininfragmentes E8 im Subfragment S1 weitgehend erhalten ist. Jedoch sind deutliche Degradationen, die sich in einer verkleinerten, endständigen Domäne und/oder in einem verkürzten, stäbchenförmigen "Stiel" äußern, sichtbar (vgl. Kap. 4.3.2.).

Im Gegensatz zum Lamininfragment E8, das in der Disk-SDS-PAGE vier Hauptbanden zeigt (Abb. 13, Spur 2, -ME), läßt sich beim Subfragment S1 lediglich ein diffuses Bandenmuster erkennen (Abb. 22, Spur 1). Obwohl das S1 immer

noch eine dem E8 ähnliche Struktur aufweist (vgl. Abb. 9 mit Abb. 17), hat doch ein weiterer proteolytischer Abbau stattgefunden.

Eine weitere Behandlung mit 100 µg Trypsin bei 37°C für 20 h eines präparativ angereicherten S1 hatte keinen weiteren Abbau zur Folge. Somit ergab die Rechromatographie des tryptischen Spaltungsansatzes von S1 keine Subframentierung, wie für das E8 gezeigt wurde; die Chromatographiebedingungen waren hierbei identisch (vgl. Abb. 24).

Erst im denaturierten Zustand konnte jedoch das Subfragment S1 in einzelne Peptide aufgetrennt werden. Nach Lyophilisation wurde S1 in Reduktionspuffer nach der beschriebenen Methode (Kap. 3.2.) reduziert und alkyliert. Die Peptide wurden durch Umkehrphasenchromatographie auf einer C4-Säule aufgetrennt. Aufgrund des komplexen Peakusters wurde jedoch auf eine Sequenzierung der Peptide verzichtet, zumal eine detailliertere, proteinchemische Sequenzanalyse wegen der Heterogenität des Subfragmentes S1 nicht möglich ist.

4.5. Aminoterminal Sequenzanalysen des E8, des 25 kD- und des S5-Subfragmentes

Im folgenden werden zunächst die aminoterminalen Sequenzierungen des S5 und des 25 kD-Fragmentes aus der tryptischen E8-Subfragmentierung beschrieben (Kap. 4.5.1. und 4.5.2.). Anschließend wird die aminoterminal Sequenzierung der A- und B-Kettenabschnitte aus dem gesamten E8 erläutert (Kap. 4.5.3.); es kann die Länge der am E8 beteiligten B-Kettenabschnitte bestimmt werden.

Nachdem die tryptischen Subfragmente und Peptide, die aus einer limitierten Proteolyse des Lamininfragmentes E8 stammen, durch proteinchemische, insbesondere sequenzanalytische Methoden untersucht sind, bleiben noch folgende Fragen zu klären:

- (1) Wie lautet die aminoterminal Sequenz des 30 kD großen Subfragmentes S5, das eine Domäne der A-Kette bildet und sich hinreichend von den anderen Subfragmenten abtrennen läßt?

Die Kenntnis des Aminoterminus ermöglicht die Festlegung des Beginns des Subfragmentes auf der DNA-Sequenz und stellt somit einen Teilschritt zur Aufklärung der Domänenorganisation der A-Kette dar.

- (2) Wie lauten die aminoterminalen Sequenzen des 25 kD-Fragmentes aus Pool S4-B (Kap. 4.3.3.2.), das proteinchemisch und immunologisch dem 25k-Fragment aus dem EHS-Tumor entspricht?

Es läßt sich beantworten, ob die beiden Fragmente aminoterminal an der gleichen Stelle gespalten wurden.

Zur Beantwortung der voranstehenden Fragen wurde E8 nach dem beschriebenen Prinzip subfragmentiert (vgl. Kap. 4.2.1.). Die Trypsinmenge wurde lediglich im Vergleich zur vorangegangenen präparativen Spaltung verdoppelt, um die Ausbeuten an kleineren Subfragmenten, die sich proteinchemisch besser charakterisieren lassen, zu erhöhen (vgl. Kap. 4.3.1.).

Die Trennung der E8-Subfragmente S1 bis S5 ergab das gleiche Elutionsmuster wie in der vorangegangenen Spaltung (vgl. Abb. 24). Lediglich die Ausbeuten an kleineren Subfragmenten S4 und S5 waren erhöht. Die Chromatographiebedingungen der TSK-Gelfiltrationen waren identisch (vgl. Abb. 16 und 24).

Die E8-Subfragmente wurden auf Heparin-Sepharose aufgetragen, um festzustellen, welches Subfragment an Heparin-Sepharose bindet.

Lediglich etwa 5 % des Materials banden an Heparin-Sepharose; es konnte durch TSK-Gelfiltration das Subfragment S2 identifiziert werden. Die Sequenzanalyse des Subfragmentes S2, das an Heparin-Sepharose bindet, scheiterte jedoch an den unzureichenden Ausbeuten nach Reinigung durch Umkehrphasenchromatographie.

Etwa 95 % des Materials band nicht an Heparin-Sepharose und wurde bereits im Auftragspuffer, der aus 0,05 M

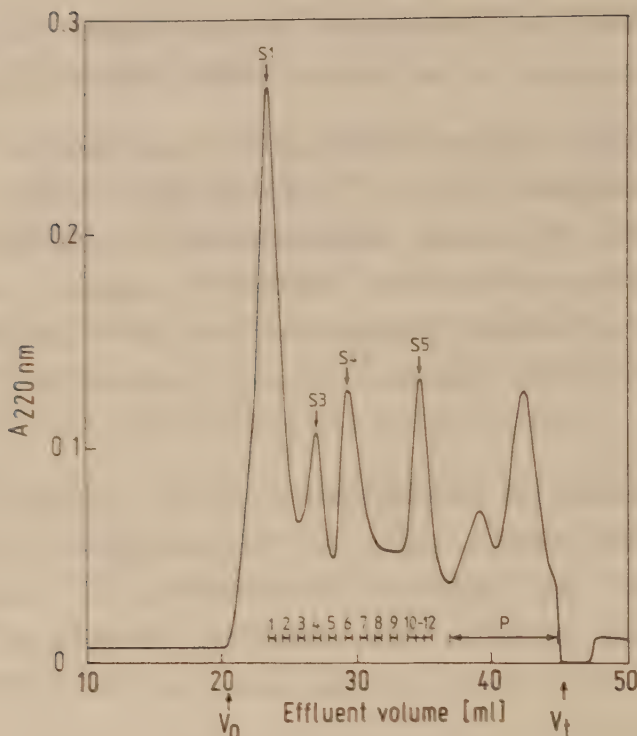


Abb. 33:

Trennung der E8-Subfragmente S1, S3 bis S5 sowie tryptischer Peptide, die nicht an Heparin-Sepharose binden. Das Subfragment S2 fehlt, da es an Heparin-Sepharose bindet (vgl. Texterklärung).

Die Chromatographie erfolgte auf zwei TSK 2000 - Säulen in tandem unter nicht-denaturierenden Bedingungen.

Die Fraktionen 1 bis 12, die im Chromatogramm markiert sind, wurden durch Disk-SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden (siehe Abb. 34A) und reduzierenden Bedingungen (siehe Abb. 34B) analysiert.

Elutionsbedingungen:

Auftrag: 0,5 ml in Elutionspuffer (aus 25 ml Lyophilisat), ansonsten wie in Abb. 16 angegeben.

Ammoniumhydrogencarbonat bestand, heruntergewaschen. In Abb. 33 ist das Chromatogramm des nicht gebundenen Materials, das aus den Subfragmenten S1, S3, S4 und S5 besteht,

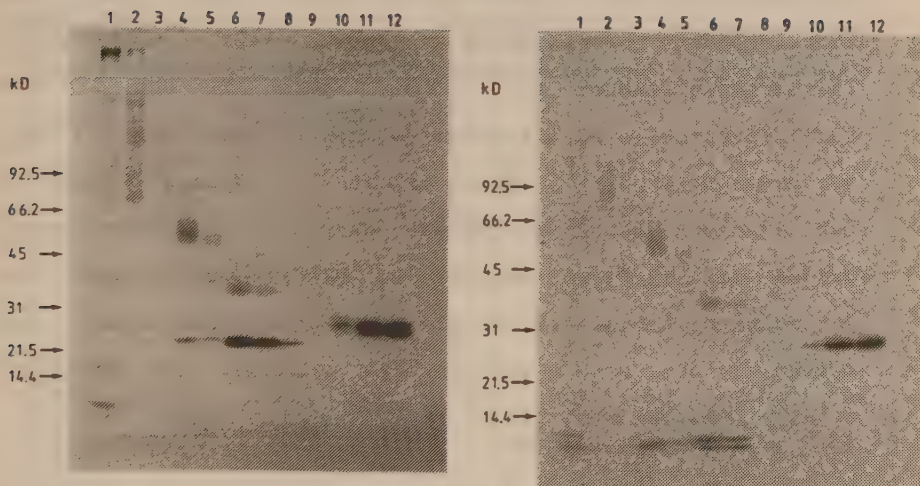


Abb. 34 A,B:

Disk-SDS-PAGE der Fraktionen 1 bis 12 (siehe Abb. 33) aus der Trennung der E8-Subfragmente, die nicht an Heparin-Sepharose binden.

Die Elektrophorese erfolgte unter nicht-reduzierenden (Abb. 34A, links) und reduzierenden Bedingungen (Abb. 34B, rechts). S5 mit 30 kD in Spur 11 und 12 ist als Teil der A-Kette nach Reduktion stabil. Die Bande des 25 kDFragmentes in Spur 6,7 zerfällt nach Reduktion in zwei Banden bei 12,5 kD, da das 25 kD-Fragment aus den C-terminalen Teilen der B-Ketten besteht, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. In Spur 1, 2 befinden sich Hauptfraktionen des Subfragmentes S1, in Spur 4, 5 Hauptfraktionen des Subfragmentes S3.

Das Auftragsvolumen beträgt jeweils etwa 20 % (v/v) eines Fraktionsvolumens.

Trenngel: 4,5 % Acrylamid

Sammegel: 5 - 25 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Coomassiefärbung

dargestellt. Demzufolge weisen die E8-Subfragmente und niedermolekulare Peptide außer S2, dessen Peak im Chromatogramm der Abb. 33 fehlt, keine Affinität an Heparin-Sepharose auf.

Die in Abb. 33 gekennzeichneten Fraktionen wurden auf Disk-SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden (Abb. 34A) und reduzierenden Bedingungen (Abb. 34B) untersucht. Insbesondere erkennt man in den Spuren 11 und 12 das reduktionsstabile S5 mit einem Molekulargewicht von 30 kD, das einen Teil der A-Kette bildet. In Spuren 6 und 7 befindet sich das 25 kD-Fragment, das nach Reduktion zwei Banden bei 12,5 kD ergibt; es handelt sich um die C-terminalen Abschnitte der B1- und B2-Kette, die nahe dem C-Terminus über eine Disulfidbrücke verbunden sind (Paulsson et al., 1985 und Abb. 34).

4.5.1. Aminoterminaler Sequenzierung des E8-Subfragmentes S5

Das 30 kD große Subfragment S5 stellt aufgrund der Sequenzanalyse tryptischer Peptide und elektronenmikroskopischer Daten einen globulären Abschnitt der A-Kette aus dem Lamininfragment E8 dar (siehe Kap. 4.3.2. und 4.3.2.). Um im Hinblick auf die DNA-Sequenzierung des C-terminalen Teils der A-Kette (Deutzmann und Huber, unveröffentl.) den Beginn der S5 Domäne festzulegen, wurde die aminoterminaler Sequenz bestimmt. Hierzu wurden acht präparative TSK-Gelfiltrationen, von denen einer in Abb. 33 dargestellt ist, durchgeführt, um eine ausreichende Proteinmenge des Subfragmentes S5 zu gewinnen (siehe Abb. 34, Spuren 11 und 12).

Nach Reduktion und Alkylierung wurde S5 durch

Umkehrphasenchromatographie auf einer Vydac C4 mit Acetonitril entsalzt. Die aminoterminal Sequenz wurde anschließend mit dem Flüssigphasensequenzator bestimmt und reproduziert. Die Sequenz lautet:

(1) 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10

K - G - C - A - L - E - P - I - Q - s

11 -12 -13 -14 -15

V - X - F - L - r

Diese Sequenz wurde bereits als tryptisches Peptid des Subfragmentes S5 identifiziert (siehe Kap. 4.3.2., Abb. 29, Sequenz (2)). cDNA-Daten aus dem N-terminalen Bereich des S5-Fragmentes liegen noch nicht vor. Die Lokalisation des S5-Subfragmentes vor dem E3 mit tryptischen Peptiden (Kap. 4.3.2.) wird in Kap. 5. diskutiert.

4.5.2. Aminoterminal Sequenzierung des reduzierten und nicht-reduzierten 25 kD-Fragmentes

Das 25 kD-Fragment, das bereits als Pool S4-B isoliert werden konnte, bildet, wie bereits gezeigt wurde, den C-terminalen Teil der B-Ketten (siehe Kap. 4.4.3.2.). Die zweite präparative Aufarbeitung der E8 Subfragmente zeigte, daß das 25 kD-Fragment nicht an Heparin-Sepharose bindet und nach Reduktion in zwei Banden bei 12,5 kD zerfällt (siehe Abb. 34, Spuren 6 und 7).

Zur Klärung der Frage, ob das aus dem E8 gewonnene 25 kD-Subfragment mit dem 25k-Fragment, das direkt aus dem EHS-Tumor isoliert wurde (Paulsson et al., 1985), identisch ist, wurden N-terminale Sequenzen bestimmt.

Es wurden aus acht präparativen TSK-Läufen, von denen einer in Abb. 33 dargestellt ist, die Fraktionen aus Pool 4 gesammelt und in Reduktionspuffer denaturiert; eine Hälfte wurde unter Zugabe von 5 % (v/v) Mercaptoethanol reduziert. Die Chromatographie des nicht-reduzierten und reduzierten 25 kD-Fragmentes fand unter gleichen Bedingungen durch Umkehrphasenchromatographie auf Vydac C4 statt (Abb. 35).

Das nicht-reduzierte 25 kD-Fragment chromatographierte in einem Hauptpeak (in Abb. 35A als "B1-B2" bezeichnet). Das Chromatogramm des reduzierten 25 kD-Fragmentes ist in Abb. 35B wiedergegeben. Der Hauptpeak des nicht-reduzierten 25 kD-Fragmentes zerfällt nach Reduktion in drei Peaks (in Abb. 35B als "B1" und "B2" bezeichnet); die Elutionszeiten sind etwas verringert. Die C-terminalen B-Kettenabschnitte des 25 kD-Fragmentes, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind, konnten nach Reduktion getrennt werden.

Die Sequenzanalyse der Peaks des nicht-reduzierten Materials ("B1-B2") ergab drei N-terminale Sequenzen, die nach Reduktion als getrennte Peaks ("B1" und "B2") analysiert werden konnten; die ersten zehn Aminosäurereste sind im Ein-Buchstaben-Code auf der übernächsten Seite angegeben:

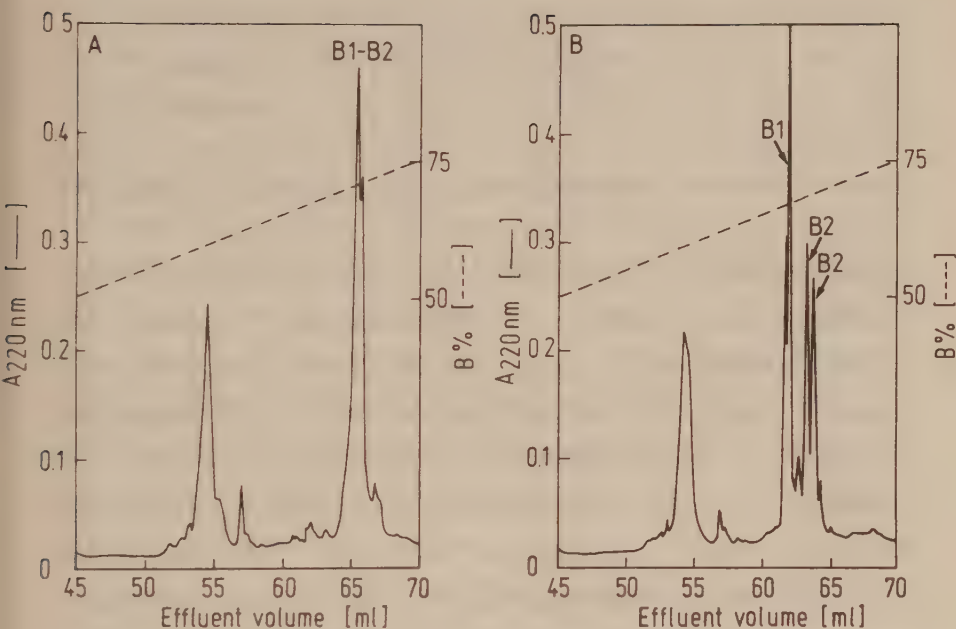


Abb. 35A,B:

Umkehrphasenchromatographie des nicht-reduzierten (Abb. 35A, links) und des reduzierten 25 kD- Subfragmentes (Abb. 35B, rechts) unter identischen Elutionsbedingungen.

Die nahe dem C-Terminus über ein Cystin verbundenen B-Kettenabschnitte (B1-B2) werden nach Reduktion in die C-terminalen B1- und B2-Kettenabschnitte des 25 kD-Fragmentes getrennt (vgl. Texterklärung).

Elutionsbedingungen:

HPLC: HPLC System III (Gradientensystem)

Säule: C4 Vydac (4,6 x 250 mm)

Temperatur: 55°C

Elutionspuffer: A: 0,1 % (v/v) TFA

B: 0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) Acetonitril

Gradient: Anfang: 90 % A, 10 % B

in 65 min: 25 % A, 75 % B

Fluß: 1 ml/min

Absorption: 220 nm

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10

(1) K - V - E - S - L - I - A - Q - K - T B1-Kette

(2) T - E - E - S - A - D - A - D - A - R B1-Kette

(3) N - S - V - S - S - L - L - S - Q - L B2-Kette

Zwei N-terminale Sequenzen konnten der B1-Kette zugeordnet werden (1) und (2); die N-Termini liegen 87 und 78 Aminosäurereste vom C-Terminus entfernt. Die dritte Sequenz stammt aus der B2-Kette (3); der Abstand des N-Terminus vom C-Terminus beträgt in diesem Fall 102 Aminosäurereste. Zur besseren Übersicht sind die N-Termini des 25 kD-Fragmentes in Abb. 41 zusammenfassend eingezeichnet, wobei die Sequenzen des 25 kD-Fragmentes unterstrichen sind. Die Zuordnung der Sequenzdaten erfolgte aufgrund von veröffentlichten cDNA Sequenzen, die die C-terminalen Teile der B-Ketten betreffen (Barlow et al., 1984).

Die verschiedenen Retentionszeiten der B2-Kettenabschnitte mit identischen N-terminalen Sequenzen ((3) s.o.) könnte auf unterschiedlicher Glykosilierung beruhen (siehe Abb. 35B Peaks, die mit "B2" beschriftet sind).

Die N-terminalen Sequenzen des reduzierten 25 kD-Fragmentes sind in Abb. 41 angegeben. Ein Vergleich der N-terminalen Sequenzen ergibt, daß das 25 kD-Fragment, das als Subfragment aus dem E8 isoliert wurde, mit dem 25k-Fragment, das direkt aus dem EHS-Tumor isoliert wurde (Paulsson et al., 1985), identisch ist. Sowohl die N-Termini bzgl. der B1-Kette als auch die N-Termini bzgl. der B2-Kette stimmen

exakt überein (vgl. Abb. 41).

Beim 25 kD-Fragment konnte lediglich zusätzlich eine um 9 Aminosäuren verkürzte N-terminale Sequenz gefunden werden. Der verkürzte, C-terminale B1-Kettenabschnitt könnte ein Degradationsprodukt darstellen, das nach den limitierten Proteolysen entstanden ist (vgl. Abb. 41).

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurde gezeigt, daß die B1- und B2-Kettenabschnitte des 25 kD-Fragmentes Heterodimere bilden (Paulsson et al., 1985). Dieses Ergebnis wird durch den Vergleich der Elutionsprofile (Abb. 35A und 35B) des nicht-reduzierten und reduzierten 25 kD-Fragmentes unterstützt: Das nicht-reduzierte 25 kD-Fragment chromatographiert in einem Peak; erst nach Reduktion lassen sich die B1- und B2-Kettenabschnitte aufgrund unterschiedlicher Retentionszeiten trennen (vgl. Kap. 5.).

4.5.3. Aminoternale Sequenzierung und Trennung der A- und B-Kettenabschnitte aus E8

Die Herstellung der E8-Subfragmente S1 bis S5 erforderte eine limitierte tryptische Proteolyse des nativen Lamininfragmentes E8 (Kap. 4.2.).

Eine weitere Möglichkeit E8 proteinchemisch zu untersuchen besteht darin, E8 als gesamtes Lamininfragment unter denaturierenden Bedingungen in seine Bestandteile zu zerlegen und diese zu trennen.

Gelelektrophoretisch besteht das gereinigte E8 im wesentlichen aus vier markanten Hauptbanden. Zwei Hauptbanden, eine stärkere bei 140 kD und eine schwächere bei 120 kD, sind reduktionsstabil. Zwei weitere Hauptbanden liegen bei 80 kD und 70 kD; sie gehen unter reduzierenden Bedingungen in eine schwache Bande bei 45 kD und eine stark hervortretende Bande bei 35 kD über (vgl. Abb. 13).

Der Verbleib bzw. der Übergang der Banden nach Reduktion wurde durch zweidimensionale Gelelektrophorese gezeigt. Hierzu wurde gereinigtes E8 in der ersten Dimension unter nicht-reduzierenden Bedingungen in das genannte Bandenmuster aufgetrennt. Anschließend wurden die einzelnen Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit Mercaptoethanol reduziert. Die Gelstücke wurden zur Elektrophorese in der zweiten Dimension in das Trenngel eingegossen und unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die zweidimensionale Gelelektrophorese ist in Abb. 36 dargestellt.

Das Auftreten schräger Banden, die stets von links unten nach rechts oben verlaufen, sind ein Hinweis darauf, daß die Hauptbanden aus Fragmenten engbeieinander liegender Molekulargewichten besteht, d.h. eine Mikroheterogenität in den Fragmentlängen aufweisen.

Aus dem gelelektrophoretischen Verhalten der E8-Hauptbanden unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen (Abb. 36) sowie den Ergebnissen der E8-Subfragmentierung lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Die reduktionsstabilen Banden bei 140 kD und 120 kD gehören

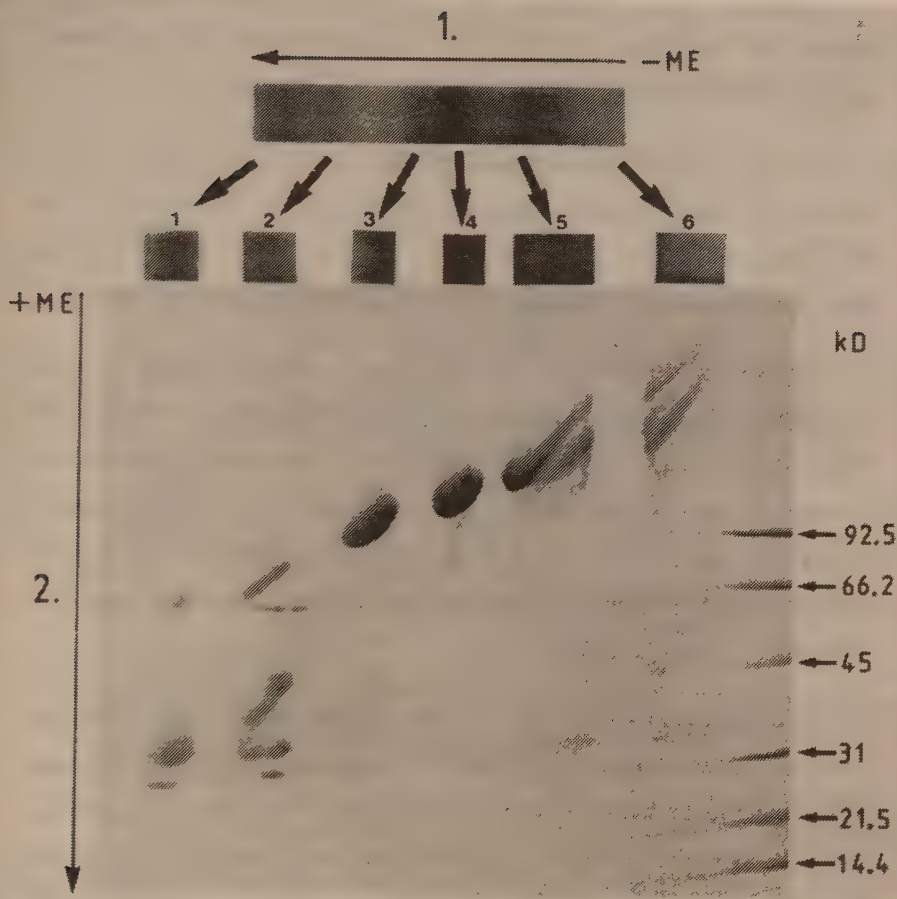


Abb. 36:

Zweidimensionale Gelelektrophorese des Lamininfragmentes E8. In der ersten Dimension (1.) wurde E8 unter nicht-reduzierenden Bedingungen (-ME) aufgetrennt. Die E8-Banden wurden ausgeschnitten, als Gelstücke mit Mercaptoethanol reduziert und in das Sammelgel eingegossen. Die zweite Dimension (2.) erfolgte unter reduzierenden Bedingungen im Elektrophorese-Laufpuffer mit 5 % (v/v) Mercaptoethanol. Zur Bestimmung des Molekulargewichtes wurde niedrigmolekularer Proteinstandard aufgetragen.

der A-Kette an, während die erwähnten reduktionslabilen Banden bei 80 kD und 70 kD, in Analogie zum 25 kD-Fragment, die C-terminalen Teile der B-Ketten darstellen.

Um dies zu klären wurden die Komponenten des Lamininfragmentes E8 durch Umkehrphasenchromatographie getrennt. Das Elutionsprofil ist in Abb. 37 abgebildet; die exakten Elutionsbedingungen können dort ebenfalls entnommen werden.

Das Elutionsprofil zeigt im wesentlichen zwei asymmetrische Hauptpeaks. Einzelne Peakabschnitte wurden als Fraktionen 1 bis 7 gesammelt (Abb. 37). Die gelelektrophoretische Analyse ergab, daß die 140 kD- und 120 kD-Fragmente im ersten Peak (Fraktionen 1 bis 3), die Banden 80 kD und 70 kD im nachfolgenden kleineren Peak (Fraktionen 5 bis 7) eluierten (Abb. 38).

In den Fraktionen 5 und 6, der ersten Hälfte des zweiten Peaks, liegt hochmolekulares Proteinmaterial mit einem diffusen Bandenbereich von 150-200 kD vor. Möglicherweise stellt dieses Material Proteinaggregate dar, die durch Disulfidaustausch entstanden sind, da dieser Bandenbereich reduktionslabil ist.

Während sich die 140 kD- und 120 kD-Fragmente im ersten Peak nicht trennen lassen, sind die 80 kD- und 70 kD-Fragmente im nachfolgenden Peak teilweise getrennt. Im hinteren Peakabschnitt (Fraktion 7) liegt das 70 kD-Fragment weitgehend gereinigt vor.

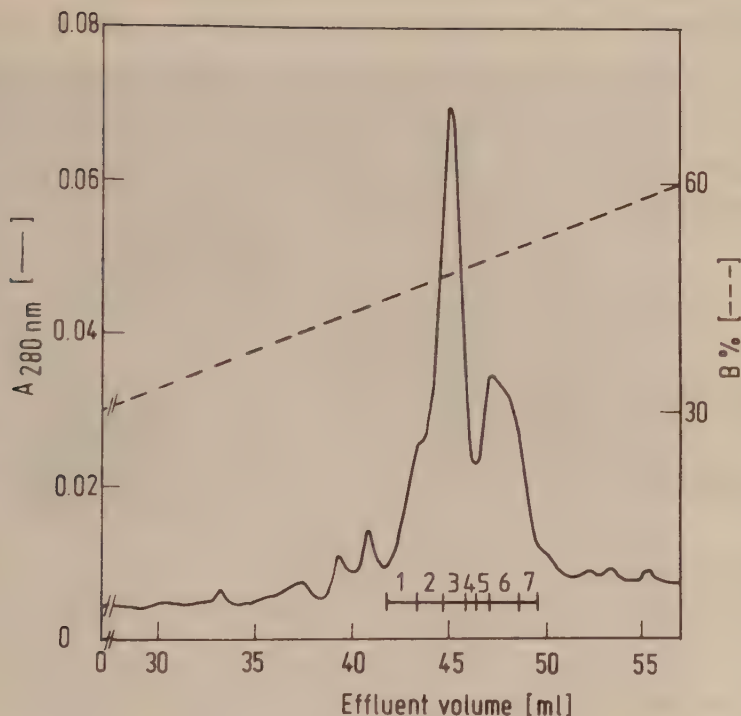


Abb. 37:

Umkehrphasenchromatographie des denaturierten Lamininfragmentes E8 auf Vydac C4. 1 mg lyophilisiertes E8 wurde in 1 ml 1 % (v/v) TFA resuspendiert und 10 min bei 60°C denaturiert. Aliquots der Fraktionen 1 bis 7 wurden durch Disk-SDS-PAGE (siehe Abb. 38) analysiert.

Elutionsbedingungen:

HPLC: System III (Gradientensystem)

Säule: C4 Vydac (4,6 x 250 mm)

Temperatur: 55°C

Elutionspuffer: A: 0,1 % (v/v) TFA

B: 0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) Isopropanol

Gradient: Anfang: 90 % A, 10 % B

in 65 min: 25 % A, 75 % B

Fluß: 1 ml/min

Absorption: 280 nm

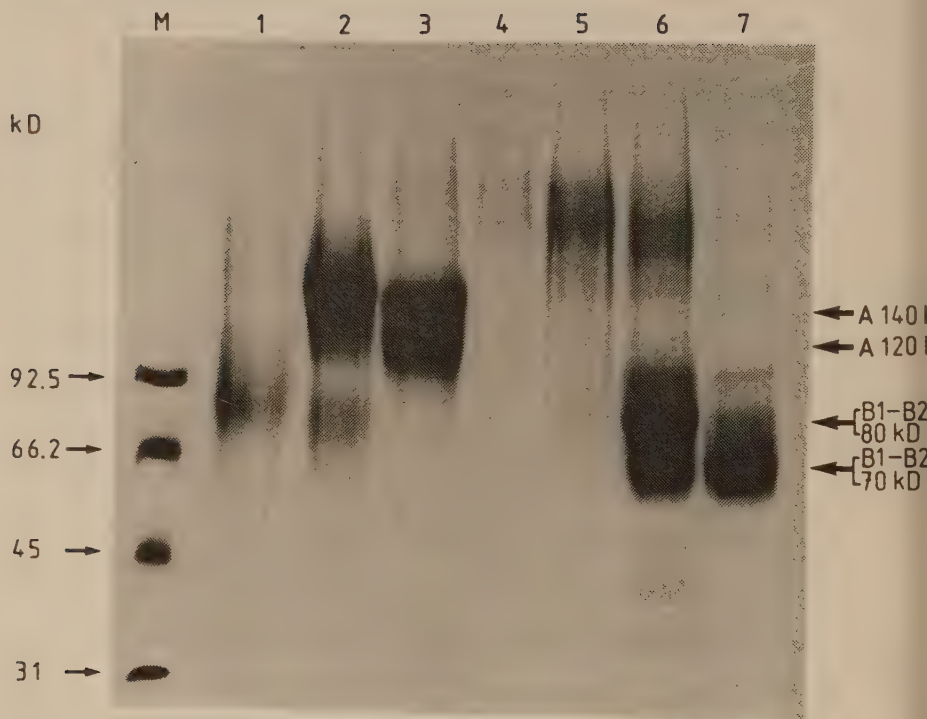


Abb. 38:

Disk-SDS-PAGE zur Kettentrennung der C-terminalen Teile der A-Kette und der über eine Disulfidbrücke verbundenen B1- und B2-Ketten aus dem Lamininfragment E8 (siehe Abb. 37).

In den Spuren 2 und 3 sind die reduktionsstabilen 140 kD- und 120 kD-Fragmente der A-Kette (A), in den Spuren 6 und 7 die reduktionslabilen 80 kD- und 70 kD-Fragmente der B-Ketten (B1-B2) aufgetragen. Die Spuren 1-7 entsprechen den Fraktionen 1-7 der Umkehrphasenchromatographie in Abb. 37. Das Auftragsvolumen beträgt jeweils etwa 20 % (v/v) eines Fraktionsvolumens.

Trenngel: 4,5 % Acrylamid

Sammegel: 5-20 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Coomassiefärbung

4.5.3.1. Aminoterminaler Sequenzierung der B-Kettenabschnitte

Die 70 kD- und 80 kD-Fragmente enthalten die B-Kettenabschnitte, deren Länge im E8 festgestellt werden sollte. Zur Bestimmung der aminoterminalen Sequenzen wurde zunächst das 70 kD- und 80 kD-Fragment voneinander präparativ getrennt. Zur Verbesserung der Reinigung wurde das 70 kD-Fragment rechromatographiert.

Während eine Hälfte des rechromatographierten 70 kD-Fragmentes direkt ansequenziert wurde, wurde die zweite Hälfte reduziert und alkyliert. Das 70 kD-Fragment zerfällt nach Reduktion in zwei 35 kD-Fragmente, die jedoch nicht durch Umkehrphasenchromatographie getrennt werden konnten.

Die aminoterminaler Sequenzierung des 70 kD - Fragmentes und der beiden 35 kD - Fragmente, die als Reduktionsprodukte entstehen, ergab folgende Doppelsequenz:

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10

a) A - T - D - V - K - V - T - A - D - M

b) N - E - K - T - R - E - A - Q - L - A

Während die Sequenz a) aus der B1-Kette stammt, gehört die Sequenz b) der B2-Kette an. Die Länge bis zum C-Terminus beträgt 202 Aminosäurereste für die B1-Kette und 208 Aminosäurereste für die B2-Kette. Die C-terminalen Teile der B-Ketten bestehen demnach im Lamininfragment E8 aus gut 200 Aminosäureresten.

Berechnet man für einen Aminosäurerest in einer α -Helix 0,15 nm, so erhält man eine Länge von 30 nm für 200

Aminosäurereste (siehe Kap. 5.); diese Länge stimmt hinreichend genau mit der Länge des stäbchenförmigen Teils aus dem E8 überein, die man aus elektronenmikroskopischen Messungen bestimmt hat (Paulsson et al., 1985).

Aus den elektronenmikroskopischen Aufnahmen ist jedoch auch ersichtlich, daß die Länge des E8-Stäbchens variiert. Dieser elektronenmikroskopische Befund weist neben der zweidimensionalen Auftrennung der E8-Hauptbanden (siehe Kap. 4.4.3. und Abb. 35) auf eine unterschiedliche Degradation des Lamininfragmentes im Stäbchen hin.

Durch N-terminale Sequenzierung konnten unterschiedliche Degradationen in den B-Ketten nachgewiesen werden.

Zunächst wurde Fraktion 6 (Abb. 37) mit den ungetrennten 80 kD- und 70 kD-Fragmenten nach Rechromatographie reduziert und alkyliert. Das 80 kD-Fragment zerfällt hierbei in ein 45 kD- und ein 35 kD-Fragment, das 70 kD-Fragment in zwei 35 kD-Fragmente (vgl. Abb. 13). Lediglich das 45 kD-Fragment kann von den 35 kD-Fragmenten durch Umkehrphasenchromatographie vollständig getrennt werden. Das Chromatogramm mit den Elutionsbedingungen ist in Abb. 39 wiedergegeben.

Es wurden die Fraktionen 1 bis 6 gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 40). Die Disk-SDS-PAGE zeigt, daß das 45 kD-Fragment in Fraktion 1 von den in den Fraktionen 2 bis 6 vorliegenden 35 kD-Fragmenten abgetrennt werden konnte. In Fraktion 2 ist außerdem noch eine 40 kD-Bande als Zwischenbande erkennbar.

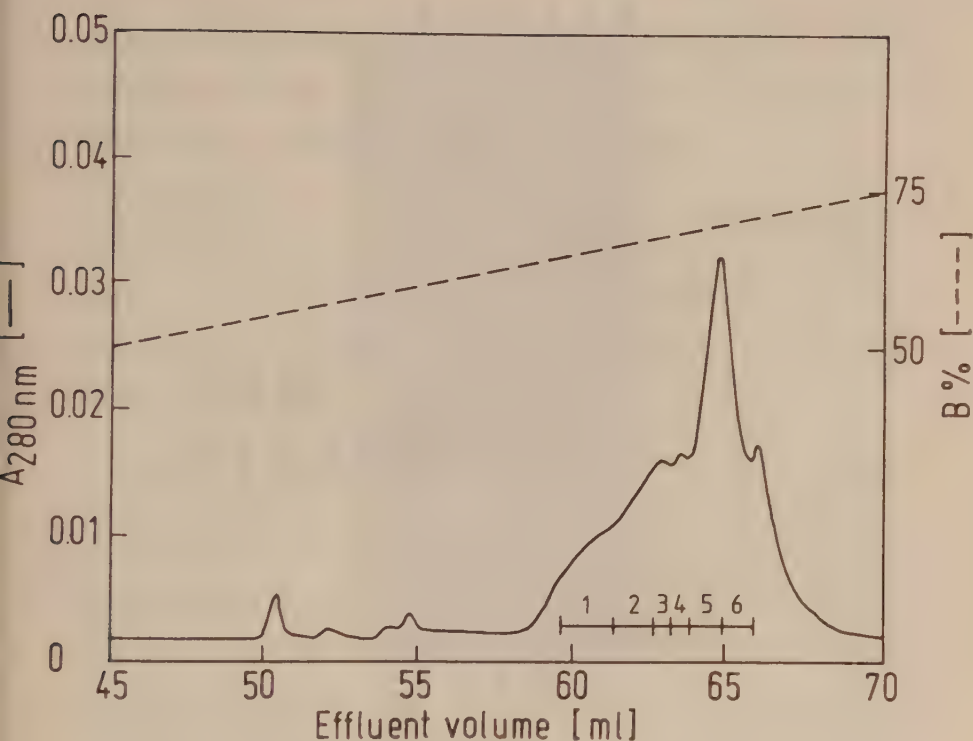


Abb. 39:

Umkehrphasenchromatographie der C-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten nach Reduktion.

Die Fraktionen 1-6 wurden durch Disk-SDS-PAGE analysiert (Abb. 40). Die C-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten entstehen nach Reduktion des 80 kD - bzw. 70 kD - Fragmentes aus dem Lamininfragment E8 (vgl. Abb. 37 und 38).

Elutionsbedingungen:

Säule: HD-Protein 7 μ (Fa. Gynkotek)

Elutionspuffer: A: 0,1 % (v/v) TFA

B: 0,1 % (v/v) TFA, 70 % (v/v) MeCN

ansonsten wie in Abb. 34.

Die Fraktionen 1, 2, 5 und 6 wurden sequenzanalytisch untersucht; die Ergebnisse sind in Tab. 2 und Abb. 41 am Ende des Kapitels zusammengefaßt. In der Regel wurden zur

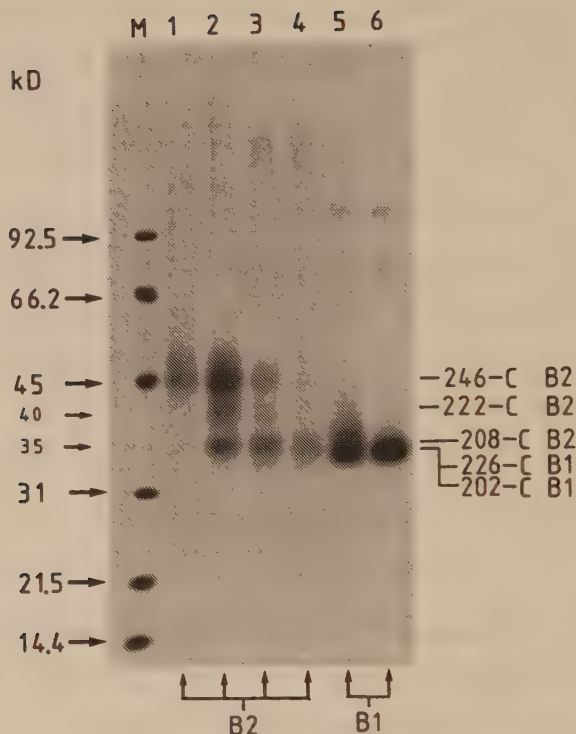


Abb. 40:

Disk-SDS-PAGE der C-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten nach Reduktion.

Die Spuren 1-6 entsprechen den Fraktionen 1-6 aus der Umkehrphasenchromatographie in Abb. 39. Die Zuordnung der Banden erfolgte durch N-terminale Sequenzen. Die C-terminalen Teile der B2-Kette (Spuren 1-4) und der B1-Kette (Spur 5, 6) sind unterschiedlich stark degradiert. Die Anzahl der Aminosäurereste bis zum C-Terminus (xxx-C) ist mit dem Molekulargewicht in kD angegeben. In Spur M wurde Proteinstandard aufgetragen.

Trenngel: 4,5 % Acrylamid

Sammelgel: 5-20 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Coomassiefärbung

Identifizierung und Zuordnung der N-terminalen Sequenzierung 8 bis 10 Aminosäurereste ansequenziert. Lediglich das 45 kD-Fragment wurde nach einer gesonderten präparativen Aufarbeitung 53 Aminosäurereste ansequenziert.

Die Sequenz des 45 kD-Fragmentes als C-terminaler Teil der B2-Kette konnte mit Hilfe der partiellen (Barlow et al., 1984) und kompletten cDNA-Sequenzen (Yamada, Y. et al., unveröffentl.) zugeordnet werden; die Länge des 45 kD-Fragmentes beträgt 246 Aminosäurereste.

Aufgrund der unveröffentlichten kompletten cDNA Sequenz konnte außerdem in Position 17 oder 230 Aminosäurereste vor dem C-Terminus des 45 kD-Fragmentes eine Lücke in der Proteinsequenz geschlossen werden. Aus der cDNA-Sequenzierung liegt dort ein Asparaginrest vor, der eine potentielle Glykosilierungsstelle darstellt, da dem Asparaginrest in übernächster Position ein Threoninrest folgt. N-Glykosidische Bindungen werden posttranslational spezifisch an den Asparaginpositionen innerhalb der Erkennungssequenzen N-X-S oder N-X-T durchgeführt. Eine vorliegende Glykosilierung könnte eine Erklärung für das hohe Molekulargewicht des 45 kD-Fragmentes in der Disk-SDS-PAGE darstellen. Eine Berechnung der unmodifizierten Proteinprimärstruktur mit 246 Aminosäureresten ergibt für das 45 kD-Fragment ein geringeres Molekulargewicht von 27 kD.

In der folgenden Tabelle (Tab. 2) sind zur besseren Übersicht die sequenzanalytisch untersuchten Fraktionen 1, 2, 5 und 6 (vgl. Abb. 40 und 41) zusammengefaßt :

Frakt.- Nr.	Bezeichnung	N-Terminus	Mol.-Gew.	Aminosäurereste bis C-Terminus
1	B2-Kette	NDI...	45 kD	246-C
2	B2-Kette	NDI...	45 kD	246-C
	B2-Kette	LRR...	40 kD	222-C
	B2-Kette	NEK...	35 kD	208-C
5,6	B1-Kette	LQQ...	35 kD	226-C
	B1-Kette	ATD...	35 kD*	202-C

Tab. 2:

Zusammenfassung der N-terminalen Sequenzen der reduzierten B1- und B2- Kettenteile aus E8.

Abb. 41: Sequenzen der C-terminalen B1- und B2- Kettenteile aus dem Lamininfragment E8

C-terminaler Teil der B1-Kette:

↓35 kD
 ↓L Q Q S A A D I A R A E L L L E E A K R A S K S ↓35 kD*
 →226 →202
 T A D M V K E A L E E A E K A Q V A A E K A I K Q A D E D I
 Q G T Q N L L T S I E S E T A A S E E T L T N A S Q R I S K
 L E R N V E E L K R K A A Q N S G E A E Y I E K V V Y S V K
 Q N A D D V K K T L D G E L D E K Y K ↓25 kD ↓25 kD*
 →87 →78
E S A D A R R K A E L L Q N E A K T L L A Q A N S K L O L L
E D L E R K Y E N N Q K Y L E D K A Q E L V R L E G E V R S
L L K D I S E K V A V Y S T C L

C-terminaler Teil der B2-Kette:

↓45 kD
 ↓N D I L N N L K D F D R R V N D N K T A A E E A ↓40 kD ↓cDNA
 →246 →222 →217
 I N R T I A E A A N E K T R E A Q L A L G N A A A D A T E A K
 →208
 N K A H E A E R I A S A V Q K N A T S T K A D A E R T F G E
 V T D L D N E V N G M L R Q L E E A E N E L K K K Q D D A D
 Q D M M M A G M A S Q A A Q E A E L N A R K A K ↓25 kD
 →102
L S Q L N N L L D Q L G O L D T V D L N K L N E I E G S L N
K A K D E M K A S D L D R K V S D L E S E A R K Q E A A I M
D Y N R N I A E I I K D I H N L E D I K K T L P T G C F N T
P S I E K P

Anmerkung:

Oberhalb der Sequenzdaten sind die Molekulargewichte der B1- und B2- Fragmente aus E8 und des 25 kD-Fragmentes (unterstrichene Sequenz) nach gelelektrophoretischer Bestimmung angegeben, unterhalb die entsprechende Anzahl der Aminosäurereste bis zum C-Terminus. Die Zuordnung erfolgte nach veröffentlichten cDNA-Daten (Barlow et al., 1984), die neben den gezeigten Sequenzdaten der B1-Kette 217 Aminosäurereste des C-terminalen Teils der B2-Kette umfassen (mit "cDNA" markiert). Außerdem lagen die kompletten cDNA-Sequenzen der B1- und B2-Ketten vor (Yamada, Y., persönl. Mitteilung).

4.5.3.2. Aminoterminaler Sequenzierung des A-Kettenabschnittes

Die Bestimmung der N-Termini der C-terminalen B-Kettenabschnitte aus E8 hat ergeben, daß die B-Ketten am Aufbau des stäbchenförmigen Teils des Lamininfragmentes E8 beteiligt sind. Ebenso muß ein Teil der A-Kette am Aufbau des stäbchenförmigen Teils beteiligt sein. Dies folgt unmittelbar aus der Tatsache, daß Partialsequenzen der A-Kette aus dem Lamininfragment E1, dem kreuzförmigen Lamininteil (Deutzmann et al., persönliche Mitteilung), und aus den endständigen, globulären Domänen S5 und E3 ermittelt werden konnten. Die A-Kette verläuft demnach durch den stäbchenförmigen Teil des langen Lamininarms und bildet mit dem C-terminalen Teil die endständigen globulären Domänen aus.

Zur Bestimmung der N-terminalen Sequenz des C-terminalen Teils der A-Kette aus E8 wurden die Fraktionen 2 und 3 (Abb. 37 und 38), die die reduktionsstabilen 140 kD- und 120 kD-Fragmente enthielten, rechromatographiert. Zunächst konnte wegen Mikroheterogenitäten der Fragmente, die durch proteolytische Degradationen entstanden waren (Kap. 4.4.3., Abb. 36), keine einheitliche N-terminale Sequenz bestimmt werden.

Durch Verkürzung der Lamininaufarbeitung mit verminderten Ionenstärken bei den Chromatographiebedingungen und kürzeren Proteolysezeiten konnte E8 in einheitlicher Form gewonnen werden. Die veränderte Aufarbeitung bewirkte, daß E8 aus

einem reduktionsstabilen 140 kD-Fragment und reduktionslabilen 80 kD-Fragment besteht. Ein Nachteil dieser Aufarbeitung besteht allerdings darin, daß sich E8 durch die präparative Agarose-Gelfiltration schlechter vom E1 abtrennen läßt und somit die Ausbeuten an E8 sinken (vgl. Kap. 4.2.).

Nach präparativer Isolierung dieses weniger degradierten E8-Fragmentes konnte die aminoterminal Sequenz bestimmt werden (Deutzmann, R. persönliche Mitteilung):

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 -10

A - H - V - H - S - N - I - Q - T - L

11 -12 -13 -14 -15 -16 -17 -18 -19

T - E - E - A - E - M - L - A - A

Zusammenfassend konnten demnach alle N-terminalen Sequenzen des Lamininfragmentes E8 bestimmt werden. Die N-terminalen Sequenzen des E8 sind neben den N-terminalen Sequenzen des 25 kD-Fragmentes in Abb. 41 zusammengefaßt.

4.6. Proteinchemische Charakterisierung des Lamininfragmentes E3

Durch die limitierte Proteolyse des Laminins mit Elastase entsteht neben E8 auch in geringen Ausbeuten das Fragment E3. E3 wurde durch präparative Gelfiltration auf Agarose 1,5m abgetrennt. Die Chromatographiebedingungen sind mit denen der E8-Reinigung identisch (siehe Abb. 10 und 43). Auf der Disk-SDS-PAGE erkennt man E3 an der charakteristischen Hauptbande bei etwa 50 kD und 55 kD (siehe Abb. 11). Die geringen Ausbeuten an E3 nach limitierter Proteolyse erforderten für die Durchführung einer präparativen E3-Isolierung die Zusammenfassung der E3-Peaks aus mehreren Agarose-Trennungen.

Die Einengung des Volumens wurde durch Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose vorgenommen. Wie für E8 beschrieben konnte das Lamininfragment E3 in 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat an Heparin-Sepharose gebunden werden; anschließend wurde es in 0,2 M Ammoniumhydrogencarbonat oder 0,5 M NaCl heruntergewaschen (vgl. Kap. 4.2.3.).

Nach Reinigung des Lamininfragmentes E3 erkennt man in der elektronenmikroskopischen Aufnahme eine globuläre Domäne (Abb. 42). Ein Western-Blot zeigt deutlich, daß sich sowohl die 50 kD- als auch die 55 kD-Bande mit anti-E3-Antikörpern nachweisen lassen (Abb. 43).

Zunächst wurde versucht durch HPLC-Gelfiltrationen die beiden E3-Fragmente, 50 kD-Fragment und 55 kD-Fragment durch

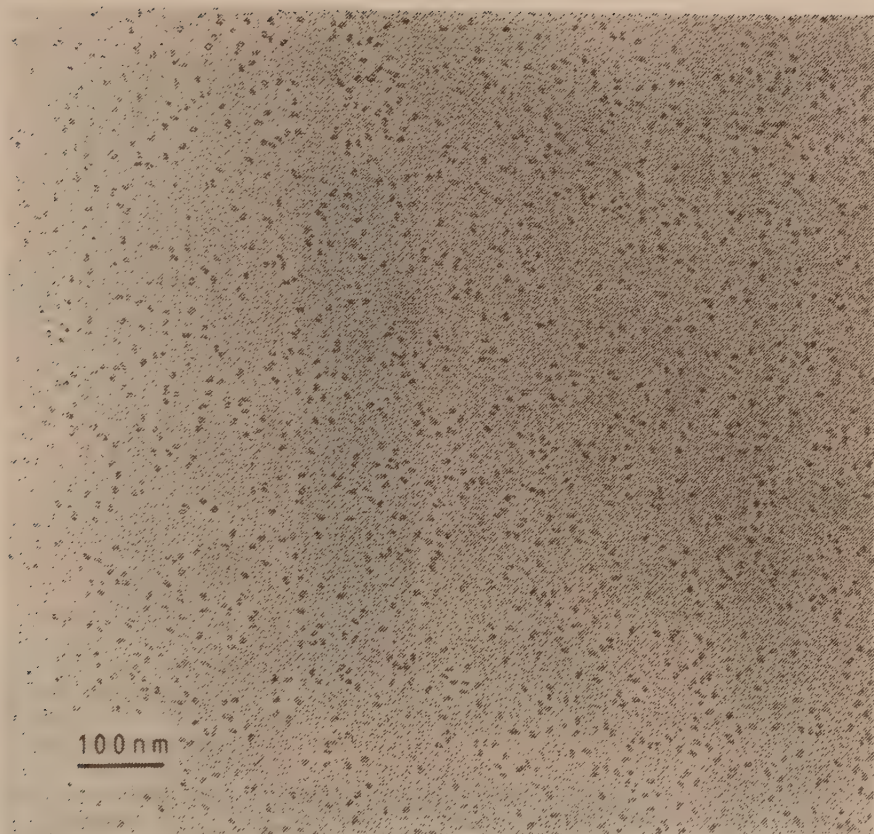


Abb. 42:
EM-Aufnahme des gereinigten Lamininfragmentes E3 nach
Affinitätschromatographie auf Heparin-Sepharose.
Vergrößerung 1:150000

HPLC-Gelfiltrationen in verschiedenen Puffersystemen zu trennen. Aufgrund des geringen Molekulargewichtsunterschiedes blieb jedoch eine Trennung erfolglos.

Außerdem wurden verschiedene Trennversuche durch Umkehrphasenchromatographie durchgeführt. Exemplarisch ist ein Chromatographielauf dargestellt (Abb. 44). Obwohl zwei Peaks im Elutionsprofil erkennbar sind, zeigt die

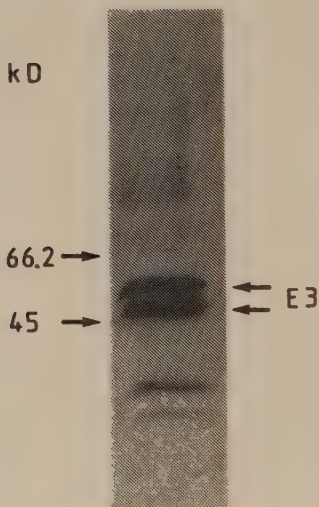


Abb. 43:

Western-Blot des gereinigten Lamininfragmentes E3 mit anti-E3-Antikörpern (freundl. Gabe von Herrn Dr. Timpl). E3 besteht nach gelelektrophoretischer Analyse aus den Hauptbanden bei 50 kD und 55 kD.

gelelektrophoretische Analyse, daß sowohl das 55 kD-Fragment als auch das 50 kD-Fragment im ersten Peak eluieren. Die Fraktionen wurden sowohl unter reduzierenden Bedingungen (mit Mercaptoethanol, + ME) als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen (ohne Mercaptoethanol, -ME) analysiert (Abb. 45). Bemerkenswerterweise beträgt das apparente Molekulargewicht der 55 kD-Bande unter reduzierenden Bedingungen etwa 60 kD. Dieses gelelektrophoretische Verhalten konnte nach unabhängiger Aufarbeitung des E3-Fragmentes eindeutig

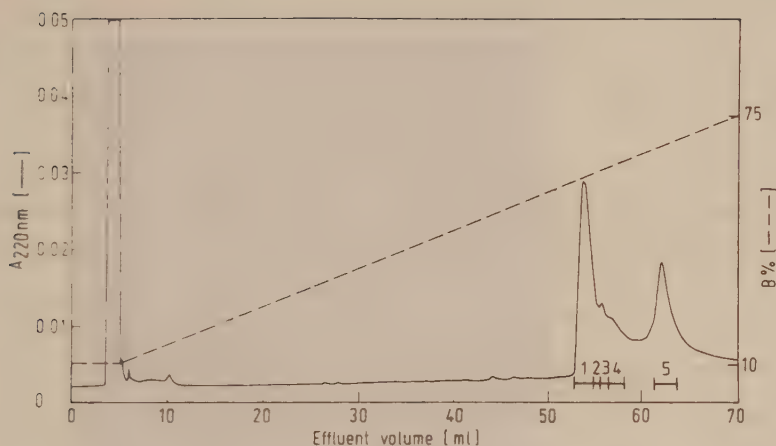


Abb. 44:

Umkehrphasenchromatographie des gereinigten Lamininfragmentes E3 auf HPLC-Umkehrphasenchromatographie.

Aliquots der Fraktionen 1 bis 5 wurden durch Disk-SDS-PAGE analysiert (siehe Abb. 45).

Elutionsbedingungen:

HPLC: HPLC-System III
 Säule: HD-Protein 7 μ (Fa. Gynkotek)
 Temperatur: 55°C
 Elutionspuffer: A: 0,1 % TFA
 B: 0,1 % TFA, 70 % MeCN

Gradient: Anfang: 90 % A, 10 % B
 nach 5 min: 90 % A, 10 % B
 nach 70 min: 25 % A, 75 % B

Fluß: 1 ml/min

Absorption: 280 nm

reproduziert werden. Eine Erklärung des höheren Molekulargewichtes könnte in der Auflösung der stark globulären Tertiärstruktur bestehen, die durch zahlreiche Disulfidbrücken aufrechterhalten wird.

Im zweiten Teil des Peaks sind noch weitere Banden erkennbar.

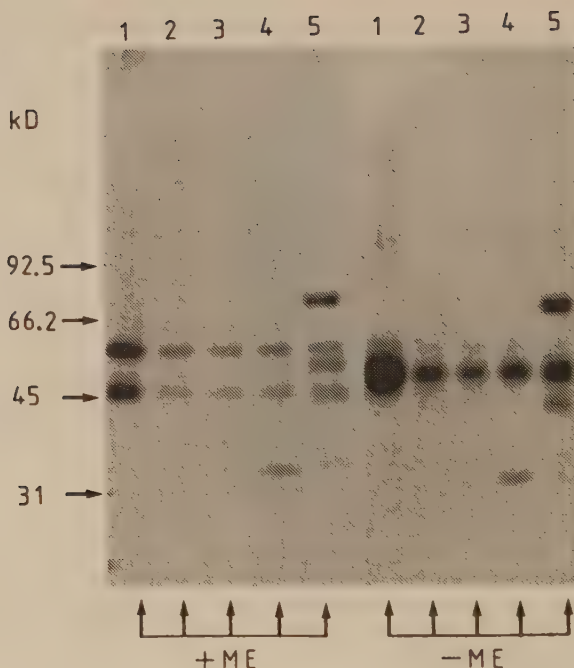


Abb. 45:

Disk-SDS-PAGE des Lamininfragmentes E3 nach HPLC-Umkehrphasenchromatographie.

Die Spuren 1 bis 5 entsprechen den Fraktionen 1 bis 5 in Abb. 44. Die Fraktionen wurden reduziert mit Mercaptoethanol (+ME) und nicht-reduziert (-ME) aufgetragen. Die Hauptbanden des nicht-reduzierten E3, die bei 50 kD und 55 kD liegen sind hier nicht wie in Abb. 43 aufgetrennt. Nach Reduktion liegen die Banden bei etwa 45 kD und 60 kD (vgl. Texterklärung).

Weitere Fragmente, die schwach an Heparin-Sepharose binden, sind in den Spuren 4 und 5 sichtbar.

Trenngel: 4,5 % Acrylamid

Sammegel: 5-25 % Acrylamid (Gradient)

Elektrophoresebedingungen: 65 V, 16 h

Detektion: Coomassiefärbung

Nach Umkehrphasenchromatographie des gereinigten E3-Fragmentes konnte folgende N-terminale Sequenz ermittelt werden, die mit den cDNA-Daten übereinstimmt:

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9

L - H - R - E - H - G - E - L - p

Weitere tryptische Peptide zur Charakterisierung des E3-Fragmentes wurden isoliert und sequenziert (Deutzmann et al., unveröffentl.).

Die Sequenz des Subfragmentes E3 wurde aus cDNA-Daten abgeleitet, nachdem mittels der Partialsequenz aus S5 ein entsprechender Klon identifiziert werden konnte (vgl. Kap. 4.4.2., Abb. 29, Sequenz (1)). Aus den cDNA Daten konnte unmittelbar entnommen werden, daß das E8-Subfragment S5 dem Lamininfragment E3 N-terminal vorausgeht (siehe Kap. 5.); letzteres bildet die C-terminal gelegene Domäne der A-Kette (Huber und Deutzmann, unveröffentl.). Der Abstand vom N-Terminus des E3 bis zum Stopcodon der translatierten Region beträgt für das E3 395 Aminosäurereste (vgl. Kap. 5.).

5. Diskussion

Die vorliegende Untersuchung stellt einen Beitrag zur Aufklärung der Struktur des Basalmembranproteins Laminin dar.

Eine detaillierte Strukturaufklärung des Proteins wurde durch Reinigungsprobleme unter Erhaltung der nativen Struktur, der Größe des Proteins (etwa 1000 kD), der Aggregationseigenschaften und der damit verbundenen Löslichkeitsprobleme erschwert (Timpl et al., 1979; Yurchenco et al., 1985).

Die proteolytische Spaltung des Proteins in Fragmente sollte sowohl zur Lokalisation der einzelnen Lamininfunktionen (z.B. Zellbindung, Kollagen IV-Bindung) dienen als auch den Verlauf der A- und B-Ketten im Molekül festlegen (vgl. Kap. 1.).

Zunächst wurde postuliert, daß die B-Ketten die kurzen Arme aufbauen und der lange Arm aus der A-Kette besteht; dies war eine Schlußfolgerung aus dem gleichzeitigen, proteolytischen Abbau des langen Armes und der A-Kette unter Erhaltung der kurzen Arme und der B-Ketten (Rao et al., 1982a,b).

Durch Kombination proteinchemischer Sequenzen und cDNA-Daten konnte jedoch gezeigt werden, daß die N-Termini sowohl der A-Kette als auch der B1- und B2-Kette in den kurzen Armen liegen. Die Primärstrukturen in den kurzen Armen sind strukturhomolog und bauen die stäbchenförmigen

und globulären Domänen auf.

Durch Sequenzierung der B-Ketten (Barlow et al. , 1984; Sasaki et al., 1987; Yamada, Y., unveröffentl.) und immunologischer Antikörpermarkierung (Paulsson et al., 1985) folgte außerdem, daß die C-terminalen Abschnitte der B-Ketten am Aufbau des langen Armes beteiligt sein mußten. Im Widerspruch stand allerdings das proteinchemische Ergebnis, daß E8 als Fragment des langen Armes gelelektrophoretisch nur aus einer Proteinbande besteht (Paulsson et al., 1985).

Die Beteiligung der C-terminalen Teile der B-Ketten lag auch aufgrund struktureller Besonderheiten nahe; dort befinden sich sogenannte Heptad-Sequenzen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen die coiled-coil Struktur im Inneren stabilisieren (Barlow et al., 1984).

Die vorliegende Arbeit sollte klären, inwieweit die C-terminalen Teile der B-Ketten an der Struktur des E8-Fragmentes beteiligt sind.

Voraussetzung dieser strukturellen Ergebnisse war die Isolierung eines geeigneten Fragmentes aus dem langen Lamininarm. Durch limitierte Proteolyse mit Elastase wird neben anderen Fragmenten E8 abgespalten, das etwa aus der Hälfte des stäbchenförmigen Teils und den endständigen, globulären Domänen des langen Armes besteht. Außerdem entsteht E3, eine endständige Subdomäne aus E8.

Die Fragmente E8 und E3 können sowohl mit Trypsin als auch mit Elastase durch limitierte Proteolyse gewonnen

werden. Das aus tryptischer Proteolyse gewonnene E8 ließ sich jedoch nicht hinreichend reproduzierbar vom Lamininfragment E1 bzw. E1-4 abtrennen, das im wesentlichen aus den drei kurzen Armen ohne bzw. mit den globulären Domänen besteht (vgl. Kap. 4.2.1.).

Erst nach limitierter Proteolyse mit Elastase wurde E8 durch präparative Gelfiltration auf Agarose reproduzierbar und in relativ guten Ausbeuten von den anderen Lamininfragmenten abgetrennt (vgl. Kap. 4.2.2.2.).

Zur weiteren Isolierung und Charakterisierung der Lamininfragmente E8 und E3 ließ sich ihre Affinität an Heparin-Sepharose ausnutzen (vgl. Kap. 4.2.2.3.). Die Elution der Heparin-Sepharose erfolgte schon mit geringer Ionenstärke. Demnach ist nicht zu entscheiden, ob die geringe Affinität von physiologischer Relevanz in vivo ist. Es ist aber nicht auszuschließen, daß durch die Proteolyse die Bindungsfähigkeit der Fragmente herabgesetzt wurde.

Durch gelelektrophoretische Analyse konnte gezeigt werden, daß die Fragmente E8 und E3 hinreichend gereinigt vorlagen (vgl. Kap. 4.2.2.). Elektronenmikroskopische Aufnahmen ließen zudem ein räumliches Abbild der Fragmente erkennen (vgl. Kap. 4.2.1.).

Gelelektrophoretisch lassen sich beim E8 vier Hauptbanden unterscheiden: zwei reduktionsstabile bei 140 und 120 kD und zwei reduktionslabile bei 80 und 70 kD. Dieses Ergebnis korrigiert die Ergebnisse, daß das Lamininfragment E8 nur

aus einer reduktionsstabilen 140 kD Bande besteht (Paulsson et al., 1985).

In der vorliegenden Untersuchung gelang der proteinchemische Nachweis, daß die reduktionsstabilen Banden den C-terminalen Teil der A-Kette und die reduktionslabilen Banden die C-terminalen Teile der B-Ketten darstellen. Aufgrund dieser Daten konnte ein neues Strukturmodell des E8-Fragmentes (Abb. 46, S. 132) und infolgedessen des Lamininmoleküls aufgestellt werden, in dem der Verlauf der A- und B-Ketten festliegt (vgl. Abb. 3 in Kap. 1.3.).

Um das Lamininfragment E8 proteinchemisch zu charakterisieren, wurden im wesentlichen zwei verschiedene Wege eingeschlagen:

- (1) E8 wurde durch limitierte tryptische Proteolyse in fünf Subfragmente gespalten, die als S1 bis S5 bezeichnet wurden (Kap. 5.1.).
- (2) Das denaturierte E8 wurde in den A-Kettenabschnitt (140 kD- bzw. 120 kD-Fragment) sowie die B-Kettenabschnitte (80 kD- bzw. 70 kD-Fragment) getrennt (Kap. 5.2.).

5.1. Untersuchung der E8-Subfragmente S1 bis S5

Um das etwa 220 kD große E8 proteinchemisch gut charakterisieren zu können, wurde es limitiert mit Trypsin gespalten. Es entstanden größere Bruchstücke mit Molekulargewichten von 25-110 kD. Das komplexe Bandengemisch konnte

durch Gelfiltration in fünf Fraktionen getrennt werden, die als Subfragmente "S1" bis "S5" bezeichnet wurden.

Die Subfragmente S1 bis S5 konnten elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Von S1 bis S5 wurde eine zunehmende Verkürzung des stäbchenförmigen Teils erkennbar, die schließlich mit dem Subfragment S5 als globuläre Domäne ihren Abschluß findet. Die gelelektrophoretische Analyse der Subfragmente ergab eine Kaskade von Banden mit absteigenden Molekulargewichten. Insbesondere das Subfragment S5 und ein 25 kD großes Fragment ließen sich gut charakterisieren und wurden weiter untersucht.

Während das Subfragment S5 der A-Kette angehört, stellt das 25 kD-Subfragment den C-terminalen Teil der B-Ketten dar. Aus diesen Befunden folgt unmittelbar, daß sowohl die A-Kette als auch die beiden B-Ketten am Aufbau des E8 im langen Lamininarm beteiligt sind (siehe Abb. 46).

Über das E8-Subfragment S5 konnten folgende Daten gewonnen werden:

- (1) S5 stellt nach der elektronenmikroskopischen Aufnahme eine globuläre Domäne aus dem Lamininfragment E8 dar (vgl. Abb. 46).
- (2) Das Molekulargewicht beträgt nach gelelektrophoretischer Bestimmung 30 kD; die Bande ist reduktionsstabil.
- (3) Das Subfragment S5 bindet nicht, wie E8, an Heparin-Sepharose.

- (4) S5 kann weder mit anti-25k- noch mit anti-E3-Antikörpern im Western-Blot nachgewiesen werden.

Die genannten Daten wurden durch proteinchemische Sequenzanalyse unterstützt und erweitert.

Zunächst wurde eine Anzahl tryptischer Peptide des Subfragmentes S5 sequenziert. Die Aminosäurereste eines Peptides gestatteten aufgrund ihrer geringen Degeneration des Translationscodes die Herstellung eines Oligonukleotides. Mit Hilfe dieses Oligonukleotides konnte ein 1,9 kb langer cDNA Klon identifiziert werden, der 548 Aminosäurereste als kodierte Region des C-terminalen Teils der A-Kette umfaßt (Deutzmann et al., unveröffentl.). Durch Vergleich der Sequenz niedermolekularer Peptide aus S5 und der N-terminalen Sequenz aus E3 mit den cDNA-Daten der A-Kette konnte S5 N-terminal von E3 lokalisiert werden (Abb. 46). Der Abstand vom N-Terminus des E3 bis zum Stopcodon der cDNA der A-Kette beträgt 395 Aminosäurereste; daraus folgt unmittelbar, daß E3 als C-terminale Domäne den Abschluß der A-Kette bildet (Abb. 46).

Aus den proteinchemischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen muß außerdem eine weitere globuläre Subdomäne, die in Abb. 46 als "SX" bezeichnet wird, postuliert werden. Elektronenmikroskopisch sind oftmals drei globuläre Strukturen unterscheidbar.

Eine Zuordnung des postulierten Fragmentes SX kann aber erst erfolgen, wenn die cDNA-Sequenzen der A-Kette in diesem Bereich komplett vorliegen. Durch Primer-Extension,

ausgehend vom S5, sollen die cDNA-Sequenzen N-terminal vervollständigt werden (Deutzmann et al., pers. Mitteilung).

Durch N-terminale Sequenzierung des Subfragmentes S5 konnte der Beginn dieser endständigen, globulären Domäne im Lamininfragment eindeutig festgelegt werden (Abb. 46).

Aus der Subfragmentierung des E8 konnte ein weiteres Subfragment mit einem Molekulargewicht von 25 kD isoliert werden (Abb. 46). Das 25 kD - Fragment hat ebenso wie S5 keine Bindungsfähigkeit an Heparin-Sepharose. Gelelektrophoretisch zerfällt die Bande nach Reduktion in zwei Banden bei 12,5 kD.

Partialsequenzen tryptischer Peptide ergaben, daß das 25 kD - Fragment ausschließlich aus den C-terminalen Teilen der B1- und B2- Ketten besteht. Die Zuordnung der Sequenzen erfolgte anhand von cDNA-Daten der C-terminalen Teile der beiden B-Ketten (Barlow et al., 1984).

Das 25 kD-Fragment wurde vor und nach Reduktion unter den gleichen Bedingungen auf HPLC-Umkehrphase chromatographiert. Die C-terminalen Teile der B1- und B2- Ketten konnten ausschließlich nach Reduktion getrennt werden. Da in den C-terminalen Teilen der B-Ketten nur jeweils ein Cystein nahe dem C-Terminus enthalten ist, besteht nur eine Möglichkeit zur Ausbildung einer reduktionslabilen Disulfidbrücke (Abb. 46).

Durch N-terminale Sequenzierung der B1- und B2-Kettenabschnitte konnte unter Verwendung der cDNA-Daten (Barlow et

al., 1984) die Länge des 25 kD-Fragmentes exakt bestimmt werden. Die C-terminalen Abschnitte der B1-Kette sind 87 und 78 Aminosäurereste lang, während der Teil der B2-Kette 102 Aminosäurereste umfaßt. Da allen drei N-Termini ein Lysinrest vorausgeht, handelt es sich um tryptische Spaltungsstellen (Abb. 46).

Die bevorzugte Spaltung an den genannten Positionen könnte durch eine Störung der coiled-coil Struktur begründet sein; an dieser Stelle ist die Wiederholung der Heptad-Sequenzen unterbrochen (vgl. Kap 1.3.).

Die geringfügige Verkürzung des B1-Kettenabschnittes um neun Aminosäurereste, beruht wahrscheinlich auf einer Degradation durch die limitierte, tryptische Proteolyse, die zur Bildung des 25 kD-Fragmentes aus E8 führte.

Aufgrund N-terminaler Sequenzen konnte in Übereinstimmung mit den immunologischen Daten die Identität des 25 kD-Fragmentes mit einem 25k-Fragment bewiesen werden, das allerdings direkt aus dem EHS-Tumor isoliert wurde (Paulsson et al., 1985). Die genannten Fragmente weisen die gleichen N-terminalen Sequenzen auf, lediglich der verkürzte, degradierte B1- Kettenabschnitt wurde beim 25k-Fragment nicht beschrieben.

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese zeigten Paulsson et al., 1985, daß die B1- und B2- Kettenabschnitte Heterodimere bilden. Dieses Ergebnis wurde durch den Vergleich der Elutionsprofile des nicht-reduzierten und reduzierten 25 kD-Fragmentes aus E8 unterstützt.

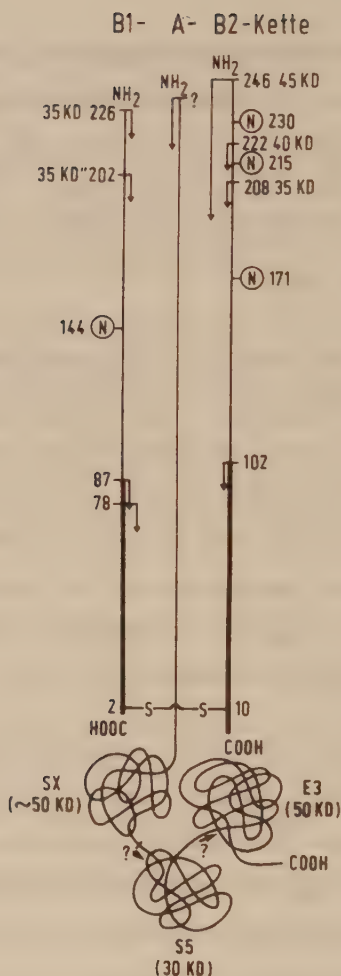


Abb. 46:

Strukturmodell des Lamininfragmentes E8.

Die C-terminalen Abschnitte der B1-, B2-Kette sowie der A-Kette mit den globulären Domänen SX, S5 und E3 sind an der Struktur beteiligt. Das 25 kD-Subfragment ist als C-terminaler Teil der B-Ketten hervorgehoben, die über eine Disulfidbrücke (S-S) verbunden sind. Die Pfeile geben die N-terminalen Sequenzierungsbereiche der jeweiligen Fragmente mit den Abständen vom C-Terminus an. Die Positionen auf der A-Kette können noch nicht lokalisiert werden, da die komplette cDNA noch nicht vorliegt. Potentielle Glykosilierungsstellen der Form N-X-T oder N-X-S sind mit "N" gekennzeichnet. Weitere Erklärungen befinden sich im Text.

5.2. Untersuchung der Lamininkettenabschnitte aus E8

Das Lamininfragment E8 besteht, wie oben erwähnt, unter den denaturierenden Bedingungen der Gelelektrophorese in SDS aus vier Hauptbanden:

- a) zwei reduktionsstabilen bei 140 kD und 120 kD als A-Kettenabschnitte,
- b) zwei reduktionslabilen bei 80 kD und 70 kD als B-Kettenabschnitte.

Nach Trennung der A- und B-Kettenabschnitte sollten die Fragmente durch N-terminale Sequenzierung identifiziert und ihre Länge, d.h. die Anzahl der Aminosäurereste bis zum C-Terminus bestimmt werden (vgl. Abb. 46). Hierzu liegen die kompletten cDNA-Daten der B-Ketten vor (Sasaki et al., 1987; Yamada, Y., unveröffentl.).

Durch zweidimensionale Gelelektrophorese, wobei die erste Dimension unter nicht-reduzierenden und die zweite Dimension - zur Auflösung der Disulfidbrücken - unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurde, konnte der Verbleib des 80 kD- und 70 kD-Fragmentes festgestellt werden.

Das 80 kD-Fragment zerfällt nach Reduktion in 45 kD und 35 kD große Fragmente, während das 70 kD große Fragment in zwei 35 kD große Fragmente übergeht.

Die gelelektrophoretische Analyse zeigte in Übereinstimmung mit den elektronenmikroskopischen Aufnahmen, daß das Lamininfragment E8 unterschiedlich stark degradiert ist.

Zunächst wurden die 140 kD- und 120 kD-Fragmente von den 80 kD- und 70 kD-Fragmenten getrennt. Die reduktionslabilen

80 kD- und 70 kD-Fragmente wurden nach Reduktion rechromatographiert. Anschließend wurden die N-terminalen Sequenzen der reduzierten Fragmente bestimmt.

Es handelt sich erwartungsgemäß um die C-terminalen Teile der B1- und B2-Ketten die unterschiedlich lang sind, d.h. aufgrund der proteolytischen Herkunft des E8-Fragmentes mehr oder weniger stark degradiert sind.

Die Abstände der N-Termini von den C-Termini betragen unter Zugrundelegung der cDNA-Daten (Barlow et al., 1984) zwischen 246 und 202 Aminosäureresten.

Die Abschnitte der B1-Kette, die gelelektrophoretisch ein Molekulargewicht von 35 kD aufweist, beginnen 226 und 202 Aminosäurereste vor dem C-Terminus (Abb. 46). Die Anzahl der Aminosäurereste der B2-Kettenabschnitte beträgt mit ihren gelelektrophoretisch bestimmten Molekulargewichten (Abb. 46): 246 (45 kD), 222 (40 kD) und 208 Aminosäurereste (35 kD).

Die C-terminalen Teile der B-Ketten bestehen demnach im Lamininfragment E8 aus etwa 250 bis 200 Aminosäureresten.

Die B-Ketten sind nahe dem C-Terminus über eine Disulfidbrücke verbunden. Während der an der Disulfidbrücke beteiligte Cysteinrest der B2-Kette zehn Aminosäurereste vor dem C-Terminus liegt, befindet sich der Cysteinrest der B1-Kette in vorletzter Position (Abb. 46). Da die kovalent verbundenen Cysteine eng benachbart sind, ergibt sich eine bzgl. der C-Termini leicht versetzte coiled-coil α -Helix (Abb. 46).

Die längste coiled-coil α -Helix, an der beide B-Ketten beteiligt sind, wird von jeweils 226 Aminosäureresten gebildet (vgl. Abb. 46). Berechnet man für einen Aminosäurerest in einer α -Helix 0,15 nm, so erhält man 34 nm für 226 Aminosäurereste. Die berechnete Länge stimmt mit der elektronenmikroskopisch bestimmten Länge des stäbchenförmigen Teils von E8 überein. Die Gesamtlänge der stäbchenförmigen Domäne wurde, von der Mitte der globulären Domäne gemessen, auf 35 +/- 3 nm, als Durchschnittswert von 140 E8-Fragmenten, bestimmt (Paulsson et al., 1985).

Demzufolge ergeben die elektronenmikroskopischen und die Sequenzdaten ein konsistentes Bild der Struktur des Lamininfragmentes E8: Die C-terminalen Abschnitte der B1- und B2-Kette sind neben der A-Kette an dem strukturellen Aufbau der stäbchenförmigen Domäne beteiligt. Die über eine Disulfidbrücke verbundenen C-terminalen Enden müssen aufgrund der dargelegten Längenverhältnisse bis an die endständigen globulären Domänen heranreichen (Abb. 46).

Während die 35 kD Fragmente der B1-Kette aufgrund des geringen Molekulargewichtsunterschiedes nicht getrennt werden konnten, gelang die Trennung des 45 kD-Fragmentes von den beiden anderen 40 kD- und 35 kD-Fragmenten der B2-Kette. Das 40 kD-Fragment entstand als zusätzliche, sichtbare Zwischenbande in geringen Ausbeuten (vgl. Abb 46).

Bemerkenswerterweise sind die Molekulargewichtsunterschiede von 5 kD bzw. 10 kD der B2-Abschnitte größer als von der Längendifferenz von 14 bzw. 38 Aminosäureresten zu

erwarten wäre. Innerhalb dieser Abschnitte, die aufgrund der Degradation wegfallen, liegen spezifische Erkennungsstellen der N-Glykosilierung von der Form N-X-T (als "N" in Abb. 46 gekennzeichnet). Arumugham et al. (1986) fanden, daß die Kohlenhydratseitenketten in einem weiten Molekulargewichtsbereich variieren, der von 1,5 bis 9,0 kD reicht. Die apparent hohen Molekulargewichte beruhen daher entweder auf verändertem gelelektrophoretischen Laufverhalten oder auf einer Glykosilierung mit großen Seitenketten. Berechnet man z. B. die Molekulargewichtssumme der Aminosäurereste des unmodifizierten 45 kD-Fragmentes, so erhält man einen geringeren Betrag von 27,2 kD.

Zusammenfassend konnte der Verlauf der Ketten im E8 bestimmt werden: der stäbchenförmige Teil wird von der A-Kette und den B-Ketten gemeinsam gebildet, am Aufbau der endständigen, globulären E8-Subdomänen ist ausschließlich die A-Kette beteiligt (Abb. 46).

Die vorliegende Arbeit diene außerdem als Grundlage weiterer laufender molekular- und zellbiologischer Arbeiten:

- (1) Sequenzierung des C-terminalen Teils der A-Kette.

Hierzu wurde eine Partialsequenz aus der A-Kette bereitgestellt, die die Identifizierung eines geeigneten cDNA-Klons gestattete.

- (2) Lokalisation der Zellbindungsstelle im Lamininfragment E8.

Es konnten die E8-Subfragmente isoliert werden, die zur

Eingrenzung der Zellbindungsstelle verwendet werden können.

- (3) Assoziation der A- und B-Ketten als tripel-coiled-coil Struktur im E8-Fragment aus dem langen Lamininarm.

Als Grundlage dient der Nachweis, daß die C-terminalen Teile aller drei Lamininketten (A-, B1- und B2-Kette) am Aufbau des stäbchenförmigen Teils im E8-Fragment beteiligt sind.

6. Zusammenfassung

Durch proteinchemische Sequenzanalysen gelang eindeutig die C-terminale Lokalisation der B1- und B2-Ketten im Lamininmolekül (vgl. Abb. 3 in Kap. 1.3.). Der strukturelle Nachweis des Verlaufs der B-Ketten wurde durch die proteinchemische Analyse des Fragmentes E8 aus dem langen Lamininarm gewonnen. Die Anzahl der Aminosäurereste liegt zwischen 208 und 248 in den C-terminalen B-Kettenabschnitten, die am Aufbau des E8 beteiligt sind (vgl. Abb. 46 in Kap. 5).

Differenzen in den Längen der Kettenabschnitte beruhen auf unterschiedlichen Degradationen, denen das E8-Fragment aufgrund seiner proteolytischen Herkunft ausgesetzt war. Berechnet man 0,15 nm pro Aminosäurerest in einer α -helikalen Sekundärstruktur, so erhält man eine Länge von etwa 30-37 nm für den stäbchenförmigen Teil des E8-Fragmentes; dies stimmt mit den elektronenmikroskopischen Längenbestimmungen hinreichend genau überein.

Für detaillierte Strukturuntersuchungen läßt sich das Lamininfragment E8 durch limitierte tryptische Proteolyse in weitere native E8-Subfragmente unterteilen. Aus diesem Abbau konnte unmittelbar ein 25 kD großes E8-Subfragment gewonnen werden, das ebenfalls C-terminale B1- und B2-Kettenabschnitte enthält, die nahe dem C-Terminus über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Nach Reduktion kann der B1-Kettenabschnitt, der aus etwa 80 Aminosäureresten besteht, vom B2-Kettenabschnitt mit etwa 100 Aminosäureresten getrennt werden.

Hierdurch konnte die Existenz der genannten Disulfidbrücke nachgewiesen werden, da in jedem Kettenabschnitt nur jeweils ein Cystein vorliegt. Ein identisches 25k-Fragment konnte bereits direkt aus dem EHS-Tumor isoliert werden (Paulsson et al., 1985).

Die Beteiligung der A-Kette am Aufbau des E8 bzw. des langen Lamininarmes konnte durch eine Reihe weiterer E8-Subfragmente gezeigt werden. Das E8-Subfragment S5 stellt eine Subdomäne aus dem globulären Teil des langen Armes dar. S5 hat ein Molekulargewicht von 30 kD und bindet nicht an Heparin-Sepharose. S5 ist, wie durch cDNA-Sequenzdaten bestätigt wurde (Huber und Deutzmann, persönl. Mitteilung), nicht identisch mit der Heparin-bindenden globulären Domäne E3 aus dem langen Lamininarm. S5 geht der C-terminal gelegenen E3 unmittelbar voraus (vgl. Abb. 46 in Kap. 5.)

7. Literaturverzeichnis

- (1) Arumugham, R.G., Hsieh, T.C.-Y., Tanzer, M.L., and Laine, R.A. (1986).
Biochim. Biophys. Acta 883, 112-126.
- (2) Barlow, D.P., Green, N.M., Kurkinen, M., and Hogan, B.L.M. (1984).
EMBO J. 3, 2355-2362.
- (3) Baron-Van Evercooren, A., Kleinman, H.K., Ohno, S., Marangos, P., Schwartz, J.P., and Dubois-Dalcq, M.E. (1982).
J. Neurosci. Res. 8, 179-193.
- (4) Barsky, S.H., Rao, C.N., Hyams, D., and Liotta, L.A. (1984a).
Breast Cancer Research and Treatment 4, 181-188.
- (5) Barsky, S.H., Rao, C.N., Williams, J.E., and Liotta, L.A. (1984b).
J. Clin. Invest. 74, 843-848.
- (6) Bernfield, M., Banerjee, S.D., Koda, J.E., and Rapraeger, A.C. (1984).
In "Basement Membranes and Cell Movement" (R. Porter, and J. Whelan, eds.), pp. 179-196.
Pitman, London.
- (7) Calof, A.L., and Reichardt, L.F. (1984).
Dev. Biol. 106, 194-210.
- (8) Carbonetto, S., Gruver, M.M., and Turner, D. C. (1983).
J. Neurosci. 3, 2324-2335.
- (9) Charonis, A.S., Tsilibary, E.C., Yurchenco, P.D., and Furthmayr, H. (1985).
J. Cell Biol. 100, 1848-1853.
- (10) Chung, A.E., Estes, L.E., Shinozuka, H., Braginski, J., Lorz, C., and Chung, C.A. (1977).
Cancer Res. 37, 2072-2081.
- (11) Chung, A.E., Jaffe, R., Freeman, I.L., Vergnes, J.-P., Braginski, J.E., and Carlin, B. (1979).
Cell 16, 277-287.
- (12) Cody, R.L., and Wicha, M.S. (1986).
Exp. Cell Res. 165, 107-116.
- (13) Cohen, C., and Parry, D.A.D. (1986).
Trends Biochem. Sci. 11, 245-248.

- (14) Cooper, A.R., and MacQueen, H.A. (1983).
Dev. Biol. 96, 467-471.
- (15) Courtoy, P.J., Timpl, R., and Farquhar, M.G. (1982).
J. Histochem. Cytochem. 30, 874-886.
- (16) Crewther, W.G., Dowling, L.M., Steinert, P.M., and Parry, D.A.D. (1983).
Int. J. Biol. Macromol. 5, 267-274.
- (17) Darmon, M.Y. (1982).
In Vitro 18, 997-1003.
- (18) Davis, G.E., Manthorpe, M., Engvall, E., and Varon, S. (1985).
J. Neurosci. 5, 2662-2671.
- (19) Dieckhoff, J., and Mannherz, H.G. (1985).
Biochim. Biophys. Acta 829, 209-220.
- (20) Dieckhoff, J., Mollenhauer, J., Köhl, U., Niggemeyer, B., von der Mark, K., and Mannherz, H.G. (1986).
FEBS Lett. 195, 82-86.
- (21) Dieckhoff, J., Niggemeyer, B., Lietzke, R., and Mannherz, H.G. (1987).
Eur. J. Biochem. 162, 451-459.
- (22) Dixit, S.N. (1985).
Connect. Tissue Res. 14, 31-40.
- (23) Dziadek, M., and Timpl, R. (1985).
Dev. Biol. 111, 372-382.
- (24) Dziadek, M., Fujiwara, S., Paulsson, M., and Timpl, R. (1985a).
EMBO J. 4, 905-912.
- (25) Dziadek, M., Paulsson, M., and Timpl, R. (1985b).
EMBO J. 4, 2513-2518.
- (26) Edgar, D., Timpl, R., and Thoenen, H. (1984).
EMBO J. 3, 1463-1468.
- (27) Edman, P., and Begg, G. (1967).
Eur. J. Biochem. 80-91.
- (28) Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J.A., Furthmayr, H., Rohde, H., and Timpl, R. (1981).
J. Mol. Biol. 150, 97-120.
- (29) Engvall, E., Krusius, T., Wewer, U., and Ruoslahti, E. (1983).
Arch. Biochem. Biophys. 222, 649-656.

- (30) Farquhar, M.G. (1981).
In "Cell Biology of Extracellular Matrix" (E.D. Hay, ed.), pp. 335-378.
Plenum, New York.
- (31) Fleischmajer, R., Timpl, R., Dziadek, M., and Lebowitz, M. (1985).
J. Invest. Dermatol. 85, 54-59.
- (32) Geisler, N., and Weber, K. (1982).
EMBO J. 1, 1649-1656.
- (33) Grotenhorst, G.R., Martin, G.R. (1986).
In "Rheumatology", vol. 10 (eds. Kühn, K., Krieg, T.) pp. 385-403.
Karger, Basel.
- (34) Grover, A. Andrews, G., and Adamson, E.D. (1983).
J. Cell. Biol. 97, 137-144.
- (35) Heathcote, J.G., and Grant, M.E. (1981).
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 9, 191-264.
- (36) Heickendorff, L., and Ledet, T. (1983).
Biochem. J. 211, 397-404.
- (37) Hewick, R.M., Hunkapiller, M.W., Hood, L.E., and Dreyer, W.J. (1981).
J. Biol. Chem. 256, 7990-7997.
- (38) Hogan, B.L.M., Barlow, D.P., and Kurkinen, M. (1984).
In "Basement Membranes and Cell Movement" (R. Porter and J. Whelan, eds.), pp.60-74.
Pitman, London.
- (39) Höök, M., Couchman, J., Woods, A., Robinson, J., and Christner, J.E. (1984).
In "Basement Membranes and Cell Movement" (R. Porter and J. Whelan, eds.), pp. 44-59.
Pitman, London.
- (40) Howe, C.C., and Dietzschold, B. (1983).
Dev. Biol. 98, 385-391.
- (41) Howe, C.C. (1984).
Mol. Cell. Biol. 4, 1-7.
- (42) Huber, H. (1986).
Diplomarbeit (Leitung: Prof. Kühn), LMU München.
- (43) Hunkapiller, M.W., Hewick, R.M., Dreyer, W.J., and Hood, L.E. (1983).
Meth. in Enzymol., 399-413.

- (44) Hunkapiller, M.W. (1985).
User Bulletin: Protein Sequencer, Fa. Applied Biosystems.
- (45) Inoue, S., Leblond, C.P., and Laurie, G.W. (1983).
J. Cell Biol. 97, 1524-1537.
- (46) Jaffe, R., Bender, B., Santamaria, M., and Chung, A.E. (1984).
Lab. Invest. 51, 88-96.
- (47) Kefalides, N.A. (1973).
Int. Rev. Connect. Tissue Res. 6, 63-104.
- (48) Kefalides, N.A., Alper, R., and Clark, C.C. (1979).
Int. Rev. Cytol. 61, 167-228.
- (49) Klapper, D.G., Wilde, C.E., Capra, J.D. (1978).
Anal. Biochem. 85, 126-131.
- (50) Kleinman, H.K., Klebe, R.J., and Martin, G.R. (1981).
J. Cell Biol. 88, 473-485.
- (51) Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., and Martin, G.R. (1983).
Biochemistry 22, 4969-4974.
- (52) Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Martin, G.R., Baron van Evercooren, A., and Dubois-Dalcq, M. (1984).
In " The Role of Extracellular Matrix in Development" (R.L. Trelstad, ed.), pp.123-143.
Liss, New York.
- (53) Kleinman, H.K., Cannon, F.B., Laurie, G.R., Hassell, J.R., Aumailley, M., Terranova, V.P., Martin, G.R., and Dubois-Dalcq, M. (1985).
J. Cell. Biochem. 27, 317-325.
- (54) Kleinman, H.K., McGarvey, M.L., Hassell, J.R., Star, V.L., Cannon, F.B., Laurie, G.W., and Martin, G.R. (1986).
Biochemistry 25, 312-318.
- (55) Kühl, U., Öcalan, M., Timpl, R., and von der Mark, K. (1986).
Dev. Biol. 117, 628-635.
- (56) Kühn, K., Wiedemann, H., Timpl, R., Risteli, J., Dieringer, H., Voss, T., and Glanville, R.W. (1981).
FEBS Lett. 125, 123-128.
- (57) Laemmli, U.K. (1970).
Nature (London) 227, 680-685.

- (58) Lander, A.D., Fujii, D.K., Gospodarowicz, D., and Reichardt, L.F. (1982).
J. Cell Biol. 94, 574-585.
- (59) Lander, A.D., Fujii, D.K., and Reichardt, L.F. (1985).
J. Cell Biol. 101, 898-913.
- (60) Laurie, G.W., Leblond, C.P., and Martin, G.R. (1982).
J. Cell Biol. 95, 340-344.
- (61) Laurie, G.W., Leblond, C.P., Inoue, S., Martin, G.R., and Chung, A. (1984).
Am. J. Anat. 169, 463-481.
- (62) Laurie, G.W., Bing, J.T., Kleinman, H.K., Hassell, J.R., Aumailley, M., Martin, G.R., and Feldmann, R.J. (1986).
J. Mol. Biol. 189, 205-216.
- (63) Laursen, R.A. (1971).
Eur. J. Biochem. 20, 89-102.
- (64) Lesot, H., Köhl, U., and von der Mark, K. (1983).
EMBO J. 2, 861-865.
- (65) Liotta, L.A., Rao, C.N., and Barsky, S.H. (1983).
Lab. Invest. 49, 636-649.
- (66) Liotta, L.A., Hand, P.H., Rao, C.N., Bryant, G., Barsky, S.H., and Schlom, J. (1985).
Exp. Cell Res. 156, 117-126.
- (67) Liotta, L.A. (1986).
Canc. Res. 46, 1-7.
- (68) Liotta, L.A., Rao, C.N., and Wewer, U.M. (1986).
Ann. Rev. Biochem. 55, 1037-1057.
- (69) Lottspeich, F. (1980).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1829-1834.
- (70) Madri, J.A., Pratt, B.M., Yurchenco, P.D., and Furthmayr, H. (1984).
In "Basement Membranes and Cell Movement" (R. Porter and J. Whelan, eds.), pp. 6-24.
Pitman, London.
- (71) Malinoff, H.L., McCoy, J.P., Varani, J., and Wicha, M.S. (1984).
Int. J. Cancer 33, 651-655.
- (72) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982).
In "Molecular Cloning", p. 456.
Cold Spring Harbor Laboratory.

- (73) Manthorpe, M., Varon, S., and Adler, R. (1981).
J. Neurochem. 37, 759-767.
- (74) Manthorpe, M., Engvall, E., Ruoslahti, E., Longo, F.M.,
Davis, G.E., and Varon, S. (1983).
J. Cell Biol. 97, 1882-1890.
- (75) Von der Mark, K., and Kühl, U. (1985).
Biochim. Biophys. Acta 823, 147-160.
- (76) Martin, G.R., Kleinman, H.K., Terranova, V.P.,
Ledbetter, S., and Hassell, J.R. (1984).
In "Basement Membranes and Cell Movement" (R. Porter
and J. Whelan, eds.) pp. 197-212.
Pitman, London.
- (77) Martinez-Hernandez, A., and Amenta, P.S. (1983).
Lab. Invest. 48, 656-677.
- (78) McCarthy, J.B., Basara, M.L., Palm, S.L., Sas, D.F.,
and Furcht, L.T. (1985).
Cancer Metastasis Rev. 4, 125-152.
- (79) McCoy, R.C., Johnson, H.K., Stone, W.J., and Wilson,
C.B. (1982).
Kidney Int. 21, 642-652.
- (80) McGarvey, M.L., Baron-Van Evercooren, A., Kleinman,
H.K., and Dubois-Dalcq, M. (1984).
Dev. Biol. 105, 18-28.
- (81) McLachlan, A.D., and Stewart, M. (1975).
J. Mol. Biol. 98, 293-304.
- (82) McLachlan, A.D., and Karn, J. (1982).
Nature (London) 299, 226-231.
- (83) Meier, S., and Drake, C. (1984).
Dev. Biol. 106, 83-88.
- (84) Merrill, C.R., Dunau, M.L., and Goldman, D. (1981).
Anal. Biochem. 110, 201-207.
- (85) Oakley, B.R., Kirsch, D.R., and Morris, N.R. (1980).
Anal. Biochem. 105, 361-363.
- (86) Ohno, M., Martinez-Hernandez, A., Ohno, N., and
Kefalides, N.A. (1983).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 112, 1091-1098.
- (87) Ohno, M., Martinez-Hernandez, A., Ohno, N. Kefalides,
N.A. (1985).
In "Basement Membranes" (S. Shibata, ed.), pp. 3-11.
Elsevier Science Publ., Amsterdam.

- (88) Ohno, M., Martinez-Hernandez, A., Ohno, N., and Kefalides, N.A. (1986).
Connect. Tissue Res. 15, 199-207.
- (89) Orkin, R.W., Gehron, P., McGoodwin, E.B., Martin, G.R., Valentine, T., and Swarm, R. (1977).
J. Exp. Med. 145, 204-220.
- (90) Ott, U., Odermatt, E., Engel, J., Furthmayr, H., and Timpl, R. (1982).
Eur. J. Biochem. 123, 63-72.
- (91) Palm, S.L., McCarthy, J.B., and Furcht, L.T. (1985).
Biochemistry 24, 7753-7760.
- (92) Paulsson, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Dalzoppo, D., Odermatt, E., and Engel, J. (1985).
EMBO J. 4, 309-316.
- (93) Rao, C.N., Margulies, I.M.K., Goldfarb, R.H., Madri, J.A., Woodley, D.T., and Liotta, L.A. (1982a).
Arch. Biochem. Biophys. 219, 65-70.
- (94) Rao, C.N., Margulies, I.M.K., Tralka, T.S., Terranova, V.P., Madri, J.A., and Liotta, L.A. (1982b).
J. Biol. Chem. 257, 9740-9744.
- (95) Rao, C.N., Goldstein, I.J., and Liotta, L.A. (1983).
Arch. Biochem. Biophys. 227, 118-124.
- (96) Richardson, J.S. (1981).
Adv. Prot. Chem. 34, 167-339.
- (97) Risteli, L., and Timpl, R. (1981).
Biochem. J. 193, 749-755.
- (98) Robinson, G.B., and Brown, R. J. (1977).
FEBS Lett. 78, 189-193.
- (99) Rogers, S.L., Letourneau, P.C., Palm, S.L., McCarthy, J., and Furcht, L.T. (1983).
Dev. Biol. 98, 212-220.
- (100) Rohde, H., Bächinger, H.P., and Timpl, R. (1980).
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 1651-1660.
- (101) Roll, F.J., Madri, J.A., Albert, J., and Furthmayr, H. (1980).
J. Cell Biol. 85, 597-616.
- (102) Rovasio, R.A., Delougee, A., Yamada, K.M., Timpl, R., and Thierry, J.P. (1983).
J. Cell Biol. 96, 462-473.
- (103) Sakashita, S., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1980).
FEBS Lett. 116, 243-246.

- (104) Sasaki, M., Kato, S., Kohno, K., Martin, G.R., and Yamada, Y. (1987).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 935-939.
- (105) Seipke, G., Müllner, H., und Grau, U. (1986).
Angew. Chem. 98, 530-548.
- (106) Shibata, S., Peters, B.P., Roberts, D.D., Goldstein, I.J., and Liotta, L.A. (1982).
FEBS Lett. 142, 194-198.
- (107) Shotton, D.M., Burke, B.E., and Branton, D. (1979).
J. Mol. Biol. 131, 303-329.
- (108) Situ, R., Lee, E.C., McCoy, J.P., and Varani, J. (1984).
J. Cell Sci. 70, 167-176.
- (109) Studier, F.W. (1973).
J. Mol. Biol. 79, 237-248.
- (110) Sugrue, S.P., and Hay, E.D. (1981).
J. Cell Biol. 91, 45-54.
- (111) Sugrue, S.P., and Hay, E.D. (1982).
Dev. Biol. 92, 97-106.
- (112) Tarr, G.E., Beecher, J.F., Bell, M., and McKean, D.J. (1978).
Anal. Biochem. 84, 622-627.
- (113) Terranova, V.P., Rohrbach, D.H., and Martin, G.R. (1980).
Cell 22, 719-726.
- (114) Terranova, V.P., Liotta, L.A., Russo, R.G., and Martin, G.R. (1982).
Cancer Res. 42, 2265-2269.
- (115) Terranova, V.P., Williams, J.E., Liotta, L.A., and Martin, G.R. (1984).
Science 226, 982-985.
- (116) Terranova, V.P., Hujanen, E.S., Loeb, D.M., Martin, G.R., Thornburg, L., and Glushko, V. (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 465-469.
- (117) Thiery, J.P., Duband, J.L., and Tucker, G.C. (1985).
Ann. Rev. Cell Biol. 1, 91-113.
- (118) Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.-M., and Martin, G.R. (1979).
J. Biol. Chem. 254, 9933-9937.

- (119) Timpl, R., Wiedemann, H., Van Delden, V., Furthmayr, H., and Kühn, K. (1981).
Eur. J. Biochem. 120, 203-211.
- (120) Timpl, R., Engel, J., and Martin, G.R. (1983).
Trends Biochem. Sci. 8, 207-209.
- (121) Timpl, R., Fujiwara, S., Dziadek, M., Aumailley, M., Weber, S., and Engel, J. (1984).
In "Basement membranes and Cell movement" (R. Porter, and J. Whelan, eds.), pp. 25-43.
Pitman, London.
- (122) Timpl, R. and Dziadek, M. (1986).
Int. Rev. Exp. Path. 29, 1-112.
- (123) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.
- (124) Vracko, R. (1974).
Am. J. Pathol. 77, 314-338.
- (125) Vracko, R. (1982).
In "New Trends in Basement Membrane Research" (K. Kühn, H.H. Schoene, and R. Timpl, eds.), pp. 1-8.
Raven, New York.
- (126) Wewer, U.M., Albrechtsen, R., Manthorpe, M., Varon, S., Engvall, E., and Ruoslahti, E. (1983).
J. Biol. Chem. 258, 12654-12660.
- (127) Wewer, U.M., Liotta, L.A., Jaye, M., Ricca, G.A., Drohan, W.N., Claysmith, A.P., Rao, C.N., Wirth, P., Coligan, J.E., Albrechtsen, R., Mudryj, M., and Sobel, M.E. (1986).
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 7137-7141.
- (128) Wu, T.-C., Wan, Y.-J., Chung, A.E., and Damjanov, I. (1983).
Dev. Biol. 100, 496-505.
- (129) Yaoita, H., Foidart, J.-H., and Katz, S.I. (1978).
J. Invest. Dermatol. 70, 191-193.
- (130) Yurchenco, P.D., Tsilibary, E.C., Charonis, A.S., and Furthmayr, H. (1985).
J. Biol. Chem. 260, 7636-7644.

Abkürzungen

A	- Ampere
$A_x \text{ nm}$	- Absorption bei x nm
Abb.	- Abbildung
AS	- Aminosäure
AUFS	- Absorbance Unit Full Scale
BSA	- Rinderserumalbumin
C-	- Carboxy-
CD	- Cirkulardichroismus
cm	- Zentimeter
$^{\circ}\text{C}$	- Grad Celsius
CMBS	- 4-(Chloromercuri-)benzoesäure
d	- Durchmesser
D	- Dalton
DE (DEAE)	- Diethylaminoethyl
Disc-SDS-	- Diskontinuierliche-Natriumdodecylsulfat-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
DMPTU	- Dimethylphenylthioharnstoff
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DTE	- 1,4-Dithioerythrit
E1-9	- Elastase-Lamininfragmente 1 bis 9
EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EHS	- Engelbreth-Holm-Swarm
EM	- Elektronenmikroskopie
Fa.	- Fabrikat der Firma
g	- Gramm
X x g	- X-fache Erdbeschleunigung
h	- Stunde
HAc	- Essigsäure
HPLC	- High Performance/Pressure Liquid Chromatographie
JAc	- Jodacetat
Kap.	- Kapitel
kD	- kilo-Dalton
kV	- kilo-Volt

l	- Liter
Lit.	- Literatur
M	- Molar
ME	- Mercaptoethanol
MeCN	- Acetonitril
mg (μ g)	- Milligramm (Mikrogramm)
MG	- Molekulargewicht
min	- Minute
ml (μ l)	- Milliliter (Mikroliter)
mm (μ m)	- Millimeter (Mikrometer)
mMol (μ Mol)	- Millimol (Mikromol)
Mol	- MG in g
N-	- Amino-
nm	- Nanometer
p.a.	- pro analysis
PAGE	- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAP	- Peroxidase-Antiperoxidase
pH	- negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PMSF	- Phenylmethansulfonylfluorid
PTH	- Phenylthiohydantoin
RT	- Raumtemperatur
S1-5	- E8-Subfragmente 1 bis 5
SDS	- Natriumdodecylsulfat
Tab.	- Tabelle
TEMED	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TPCK	- Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon
Tris	- Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
u	- Units
Upm	- Umdrehungen pro Minute
v/v	- Volumen/Volumen
w/v	- Gewicht/Volumen
w/w	- Gewicht/Gewicht

L E B E N S L A U F

Konrad Achim Schmetz

geboren am 15. Januar 1954 in Brühl

1960 - 1964	Volksschule Brühl-Kierberg
1964 - 1965	Privatschule Hermann-Josef-Kolleg Steinfeld
1965 - 1973	Neusprachliches Gymnasium Brühl
Mai 1973	Allgemeine Hochschulreife
1973 - 1976	Studium an der Erziehungswissenschaftlichen Fakultät der Universität Köln
Oktober 1976	Erstes Staatsexamen für das Lehramt an der Grund- und Hauptschule
1976 - 1982	Studium der Biologie an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln
1982 - 1983	Anfertigung der Diplomarbeit am Institut für Genetik der Universität zu Köln bei Prof. Dr. K. Beyreuther
Oktober 1983	Diplom - Hauptprüfung
1983 - 1984	Doktorand am Institut für Genetik der Universität zu Köln
Seit 1984	Doktorand am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried Abt. Bindegewebeforschung, Prof. Dr. K. Kühn

